



HAL
open science

Étude structurale et fonctionnelle des propriétés d'interaction à l'ubiquitine de la protéine CEP55, un régulateur essentiel de la cytokinèse

Keis Nabhane Said Halidi

► **To cite this version:**

Keis Nabhane Said Halidi. Étude structurale et fonctionnelle des propriétés d'interaction à l'ubiquitine de la protéine CEP55, un régulateur essentiel de la cytokinèse. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066609 . tel-01954487

HAL Id: tel-01954487

<https://theses.hal.science/tel-01954487>

Submitted on 13 Dec 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

Plateforme de Criblage Chémogénomique et Biologique

Étude structurale et fonctionnelle des propriétés d'interaction à l'ubiquitine de la protéine CEP55, un régulateur essentiel de la cytocinèse

Par Keïs Nabhane Said Halidi

Thèse de doctorat de Biochimie et de Biologie Cellulaire

Dirigée par Fabrice Agou

Présentée et soutenue publiquement le 7 Décembre 2017

Devant un jury composé de :

Pr El Amri Chahrazade

Dr Dejardin Emmanuel

Dr Fourmy Dominique

Dr Agou Fabrice

Dr Cordier Florence

Pr Mhlanga Musa

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Résumé

La protéine CEP55 pour Centrosomal protein 55 kDa est un régulateur essentiel de la dernière étape de la division cellulaire appelée cytokinèse. En utilisant des approches de bio-informatique, structure-fonction et de biologie cellulaire, nous montrons que CEP55 comporte deux nouveaux domaines d'interaction à l'ubiquitine, qui sont similaires à ceux de la protéine NEMO, NOA^{CEP55} et ZF^{CEP55} et qui régulent différemment la fonction de CEP55 durant la cytokinèse. Des études de modélisation structurale, mutagenèse dirigée et de biophysique de ces domaines ont permis de mettre en évidence que NOA^{CEP55} adopte une structure dimérique de type « coiled-coil » et interagit préférentiellement avec des chaînes d'ubiquitine linéaires (M1). Néanmoins, ZF^{CEP55} présente une architecture de type zinc finger ou UBZ et se lie préférentiellement avec des chaînes d'ubiquitine K63 et M1. De plus, nous mettons en évidence que ZF^{CEP55} est indispensable au recrutement de CEP55 au midbody de façon dépendante de son interaction avec l'ubiquitine. A *contrario*, NOA^{CEP55} joue un rôle déterminant en aval du recrutement de CEP55 au midbody. Dans un second volet, nous montrons que NOA^{CEP55} et ZF^{CEP55}, qui sont séparés par un domaine charnière riche en proline, interagissent *in vitro* de manière coopérative avec de longues chaînes d'ubiquitine K63 et que cette interaction est modulée par phosphorylation et isomérisation d'acteurs physiologiques associés à CEP55. Enfin, ces résultats ont permis d'identifier par criblage de siRNA des ubiquitine ligases et déubiquitinases impliquées dans la cytokinèse, qui permettent de discuter du rôle de la signalisation de l'ubiquitine dans ce processus cellulaire.

Mots clés : CEP55, ubiquitine, récepteur à l'ubiquitine, cytokinèse, division cellulaire, cancer

Summary

CEP55 (Centrosomal protein 55 KDa) critically regulates the final step of cell division termed cytokinesis. In the first part, using bioinformatical, structure-function and cell biology approaches, we showed that CEP55 contains two new NEMO-like ubiquitin binding domains, NOA^{CEP55} and ZF^{CEP55}, which differentially regulate CEP55 function during cytokinesis. Structural modeling, mutagenesis and biophysical studies of both domains pointed out that NOA^{CEP55} adopts a dimeric coiled-coil structure and selectively interacts with linear ubiquitin chains (M1). However, ZF^{CEP55} presents a zinc-finger scaffold – or UBZ – and preferentially binds to K63 and M1 ubiquitin chains. Moreover, our results highlight that ZF^{CEP55} functions as a cargo receptor to the midbody in an ubiquitin dependent manner whilst NOA^{CEP55} plays a crucial role in cytokinesis but acts downstream of CEP55 recruitment to the midbody. In the second part, we showed that NOA^{CEP55} and ZF^{CEP55} separated by a proline rich linker cooperatively interact with long K63 poly-ubiquitin chains and this interaction can be modulated by phosphorylation and isomerization via CEP55 physiological partners. Finally, these results allowed us to identify E3-ligases and deubiquitinases involved in cytokinesis, which permit to discuss the role of ubiquitin signaling in this cellular process.

Key words : CEP55, ubiquitin, ubiquitin binding domain, cytokinesis, cell division, cancer

*À Ezio, Leo, Héloïse et Djunaïd
Nelly et Mouhamadi
Hedi et Amine
Olivia*

Remerciements

J'exprime ma plus sincère gratitude à mon directeur de thèse, Fabrice Agou, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour son accompagnement tout au long de ce projet, sa disponibilité permanente, son soutien scientifique et humain, et sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Fabrice Agou s'est grandement investi pour me permettre d'effectuer ma thèse dans les meilleures conditions et pour son aide à l'élaboration de mon avenir professionnel, je l'en remercie grandement.

Je tiens à remercier la Ligue nationale contre le cancer d'avoir financé mon projet de thèse durant ces trois dernières années.

Je souhaite adresser mes remerciements à Emmanuel Dejardin, Dominique Fourmy, Florence Cordier, Musa Mhlanga et Chahrazade El-Amri qui ont accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse.

Je tiens ensuite à remercier toute l'équipe de la Plateforme de criblage chémogénomique et biologique pour m'avoir permis de travailler dans un environnement de confiance, de convivialité et d'ouverture toujours dans la bonne humeur. Plus que des collègues, ils sont devenus de véritables amis. Je remercie l'équipe pour les moments inoubliables passés au laboratoire comme chez Fred et dans des restaurants diététiques dans lesquels les tartiflettes, les raclettes, les fondues, sans oublier les fameuses truffades, nous ont régales ! Elisabeth Fontan pour son aide constante et pour m'avoir formé aux subtilités de la biochimie avec une grande patience. Alix Boucharlat (Pititm) qui a toujours été présente pour moi et pour nos nombreux fous rires partagés... Merci à Laurianne Davignon pour sa grande disponibilité et ses nombreux conseils scientifiques. Je remercie vivement Marine Charpentier (Meurine), Sara Consalvi (Sarra), Agnès Zettor (Œil de lynx) pour leur gaité, leur aide et leur soutien dans les moments les plus importants de l'écriture de mon manuscrit de thèse. Merci également au tout nouvel arrivant de l'équipe Mikaël Boullé pour ses conseils.

Je remercie vivement le laboratoire de Signalisation et Pathogénèse dirigé par Robert Weil pour sa disponibilité et de m'avoir accueilli durant le début de ma thèse. Un grand merci à Emmanuel Laplantine pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons

partagées, son soutien scientifique et personnel ainsi que pour m'avoir initié aux joies de la biologie cellulaire toujours dans la bonne humeur. Merci à Pierre Genin pour ses conseils scientifiques notamment sur l'utilisation du microscope ainsi que pour son humour.

Je tiens également à remercier le professeur Alain Israël de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire Signalisation Moléculaire et Activation Cellulaire durant mon stage de Master 2.

Je souhaiterais remercier Marie-Dominique Aytac, Martine Belin et Christine Detchepare qui m'ont été d'une aide précieuse dans les multiples démarches administratives à l'Institut Pasteur.

Je remercie l'unité de Spectrométrie de masse pour la biologie de l'Institut Pasteur dirigée par Julia Chamot-Rooke dont la Plateforme de protéomique gérée par Mariette Matondo-Bouzanda; et particulièrement Thibault Chaze qui a identifié le résidu phosphorylé de la protéine GST-NOAZ de CEP55. Merci également à la Plateforme de Biophysique Moléculaire dirigée par Patrick England et à Bruno Baron d'avoir mis à ma disposition les appareils d'analyse dont le fluorimètre PTI.

Je tiens évidemment à remercier ma famille et mes amis pour leur confiance et leur soutien pendant ces trois années de ma vie et pour qui je n'ai pas pu être autant disponible que je l'aurai souhaité. Particulièrement, mes parents, Nelly et Mouhamadi Nabhane, mon frère et ma belle-sœur, Djunaïd et Heloïse Nabhane qui m'ont soutenu et su me redonner du courage dans les moments les plus difficiles. Un grand merci à «ma frère» Hedi Bouazza, à Marie-José Bouazza et à Fella Bouchouchi notamment pour leur aide précieuse dans la correction de mon manuscrit de thèse. Une pensée particulière pour Tatie Danielle, je sais qu'elle aurait aimé lire ce manuscrit.

Enfin, je ne pourrais terminer ces remerciements sans citer ma conjointe Olivia Severin. Son amour, son intelligence et son indéfectible confiance m'ont guidé au quotidien. Merci d'avoir su faire preuve de compréhension et de patience dans les moments où j'étais le moins disponible...

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| Table des illustrations | 11 |
| Principales abréviations | 13 |
| INTRODUCTION | 16 |
| Chapitre 1 : la signalisation liée à l'ubiquitine | 18 |
| Préambule | 18 |
| I) L'ubiquitination et les enzymes impliquées | 21 |
| A. Principe de l'ubiquitination | 21 |
| B. Les enzymes de synthèse de l'ubiquitine | 22 |
| C. Les enzymes de désassemblage de l'ubiquitine | 26 |
| D. Diversité structurale de l'ubiquitine et des chaînes de poly-ubiquitine | 30 |
| II) Les domaines d'interaction aux ubiquitines (UBDs) | 36 |
| A. La classification des domaines UBDs | 36 |
| 1. Les UBDs tout α | 36 |
| 2. Les UBDs α/β | 40 |
| 3. Les UBDs tout β | 42 |
| B. Les principes de la reconnaissance sélective des récepteurs à l'ubiquitine | 43 |
| C. Les UBDs de NEMO | 46 |
| 1. Le domaine NOA/UBAN | 46 |
| 2. Le domaine NOAZ | 48 |
| D. Les UBDs bâtis sur une structuration ZF | 49 |
| 1. La famille des ZFs : généralités et principe de structuration | 49 |
| 2. Les outils de classification des ZFs | 51 |
| 3. La diversité de structures et de modes d'interaction à l'ubiquitine des ZFs UBD | 54 |
| a. Les NZFs | 54 |
| b. Les A20-ZFs | 58 |
| c. Les UBZs | 61 |
| d. Les ZF-UBPs | 67 |
| III) Diversité fonctionnelle de l'ubiquitine | 69 |
| A. La démographie cellulaire de l'ubiquitine et des chaînes de poly-ubiquitine | 69 |
| B. Le code de l'ubiquitine | 70 |
| C. La complexité croissante du code de l'ubiquitine | 75 |
| 1. Les chaînes hétérotypiques | 75 |
| 2. L'ubiquitine est modifiée par des modifications post-traductionnelles | 77 |
| Chapitre 2 : division cellulaire, cytokinèse et CEP55 | 80 |
| Préambule | 80 |
| I) La division cellulaire, la mitose et les phases précoces de la cytokinèse | 81 |
| A. Les phases du cycle cellulaire et la mitose | 81 |
| B. Les centrosomes et les microtubules : définitions | 83 |
| C. La régulation du cycle cellulaire | 85 |
| 1. Les complexes CDK/Cycline | 85 |
| 2. Les mécanismes de surveillance de la progression du cycle cellulaire | 85 |
| D. La cytokinèse : définition, vue d'ensemble et phases précoces | 86 |
| 1. Spécification du plan de clivage | 89 |
| a. Formation du fuseau central | 89 |
| b. La régulation de la protéine RHOA | 91 |
| 2. Formation et contraction de l'anneau contractile | 93 |

| | |
|--|------------|
| II) Les phases tardives de la cytokinèse : de la formation du pont intercellulaire à l'abscission | 96 |
| A. L'architecture globale du pont intercellulaire et du midbody | 97 |
| B. La formation du midbody et la stabilisation du pont intercellulaire | 100 |
| C. Maturation du pont intercellulaire et abscission..... | 103 |
| 1. Le trafic vésiculaire : dépolymérisation de l'actine et formation de la seconde ingression | 105 |
| 2. Les ESCRTs : assemblage, coupure des microtubules et scission membranaire | 108 |
| D. Le point de contrôle de l'abscission | 115 |
| E. Les midbody post-abscission..... | 118 |
| F. L'ubiquitine et le pont intercellulaire | 120 |
| III) La protéine CEP55 | 126 |
| A. CEP55, une protéine indispensable au processus d'abscission | 126 |
| 1. Généralités sur CEP55 et son recrutement au midbody | 126 |
| 2. Interactions CEP55/ALIX /TSG101 et oligomérisation au midbody | 127 |
| 3. Implications fonctionnelles de CEP55 durant l'abscission | 132 |
| 4. Régulation de CEP55 par phosphorylation et trans-isomérisation | 136 |
| B. Cytokinèse sans abscission : les cellules germinales et l'inhibition naturelle de CEP55..... | 142 |
| C. Autres fonctions de CEP55 | 143 |
| D. Pathologies humaines associées à une dérégulation de CEP55 | 147 |
| 1. CEP55 et cancers | 147 |
| 2. Nouvelles pathologies associées à CEP55..... | 149 |
| Chapitre 3 : problématique de la thèse | 152 |
| MATÉRIELS ET MÉTHODES | 154 |
| RÉSULTATS | 162 |
| Chapitre 1 : CEP55 contient deux domaines d'interaction à l'ubiquitine similaires à ceux de NEMO qui sont impliqués dans la cytokinèse..... | 164 |
| I) PRÉAMBULE | 164 |
| II) ARTICLE EN PRÉPARATION | 167 |
| III) COMMENTAIRE | 167 |
| A. Caractérisation cellulaire et étude phénotypique de la lignée U20S K.O CEP55 générée par la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9..... | 167 |
| B. Rôle du ZF de CEP55 dans l'interaction avec les partenaires physiologiques de CEP55 au midbody | 169 |
| Chapitre 2 : étude des propriétés d'interaction aux chaînes de poly-ubiquitine du domaine bipartite NOAZ de CEP55 et de leur régulation par des modifications post-traductionnelles et des changements conformationnels | 173 |
| CONCLUSION/DISCUSSION | 183 |
| I) Les propriétés d'interaction à l'ubiquitine des domaines NOA, UBZ et NOAZ de CEP55 | 185 |
| A. Les résidus 435-464 de CEP55 forment un domaine UBZ dont le mode d'interaction à l'ubiquitine est le plus conservé avec celui de la sous-famille UBZ WRNIP1/RAD18 | 185 |
| B. Les résidus 304-396 forment un domaine NOA proche de ABIN2 | 188 |
| C. La coopérativité des domaines NOA et UBZ au sein de NOAZ et sa régulation | 190 |
| II) Rôles fonctionnels des UBDs de CEP55 dans la cytokinèse et la dégradation des midbody remnant | 193 |
| A. La fonction du domaine NOA et son rôle en aval du recrutement de CEP55 au midbody | 194 |
| B. Le domaine UBZ est crucial dans le recrutement de CEP55 au midbody | 197 |
| C. Le domaine UBZ de CEP55 aurait-il un rôle en aval du recrutement de CEP55 au midbody ?.. | 202 |
| D. Rôle fonctionnel de la coopérativité des domaines NOA et UBZ ainsi que de leur régulation ... | 203 |

| | |
|--|------------|
| E. Quelles sont les enzymes associées à l'ubiquitome qui pourraient être impliquées dans la fonction de CEP55 au midbody ? | 205 |
| III) Implications des UBDs de CEP55 dans d'autres fonctions cellulaires et dans les pathologies associées à CEP55 | 206 |
| BIBLIOGRAPHIE | 209 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|--|------------|
| <i>Figure 1 : Modèle proposé de la voie de dégradation dépendante de APF1 (ubiquitine) en 1980.....</i> | <i>19</i> |
| <i>Figure 2 : Vue schématique de la réaction de mono-ubiquitination</i> | <i>22</i> |
| <i>Figure 3 : Machinerie enzymatique de l'assemblage de l'ubiquitine.....</i> | <i>23</i> |
| <i>Figure 4 : Les différentes familles d'E3 ligases présentent des mécanismes catalytiques différents.....</i> | <i>25</i> |
| <i>Figure 5 : Les DUBs permettent de générer le pool d'ubiquitine cellulaire</i> | <i>28</i> |
| <i>Figure 6 : Principe de l'édition de chaînes par la collaboration des enzymes d'assemblage et désassemblage de l'ubiquitine</i> | <i>29</i> |
| <i>Figure 7 : Structure de l'ubiquitine</i> | <i>30</i> |
| <i>Figure 8 : Zones principales de l'ubiquitine impliquées dans des interactions non-covalentes.....</i> | <i>32</i> |
| <i>Figure 9 : Diversité structurale des chaînes de di-ubiquitine</i> | <i>33</i> |
| <i>Figure 10 : Les UBDs de ALIX et de TSG101.....</i> | <i>40</i> |
| <i>Figure 11 : Exemple du mécanisme de sélectivité conféré par avidité au sein de la protéine RAP80.....</i> | <i>45</i> |
| <i>Figure 12 : Le domaine NOA de NEMO</i> | <i>48</i> |
| <i>Figure 13 : Schéma de la coopérativité des domaines NOA et ZF de NEMO.....</i> | <i>49</i> |
| <i>Figure 14 : Représentation topologique de deux ZFs en tandem</i> | <i>50</i> |
| <i>Figure 15 : Estimation de la proportion des types de motifs de tétracoordination en fonction de leur nature et leur position chez l'homme.....</i> | <i>51</i> |
| <i>Figure 16 : Classification structurale des ZFs.....</i> | <i>53</i> |
| <i>Figure 17 : Classification des familles NZF, A20-ZF et UBZ en fonction de leurs motifs structuraux et de leurs motifs de coordination.....</i> | <i>55</i> |
| <i>Figure 18 : Mode de reconnaissance de l'ubiquitine par les NZFs.....</i> | <i>57</i> |
| <i>Figure 19 : Les domaines A20-ZFs utilisent un grand nombre de sites différents simultanément pour se lier à l'ubiquitine</i> | <i>60</i> |
| <i>Figure 20 : Mode d'interaction des UBZ qui reconnaissent l'ubiquitine de façon centrée sur l'hélice α.....</i> | <i>63</i> |
| <i>Figure 21 : Mode d'interaction à l'ubiquitine des UBZ « WRNIP1-like »</i> | <i>64</i> |
| <i>Figure 22 : Mode d'interaction du l'UBZ de NEMO.....</i> | <i>66</i> |
| <i>Figure 23 : Structure des ZF-UBPs.....</i> | <i>67</i> |
| <i>Figure 24 : Mode de reconnaissance de l'ubiquitine par les ZF-UBPs.....</i> | <i>68</i> |
| <i>Figure 25 : Schéma représentant les proportions approximatives des différents types d'ubiquitine cellulaire.....</i> | <i>70</i> |
| <i>Figure 26 : Fonctions principales des différents types d'ubiquitine : le code de l'ubiquitine.....</i> | <i>72</i> |
| <i>Figure 27 : Fonctions des chaînes d'ubiquitine hétérotypiques décrites</i> | <i>76</i> |
| <i>Figure 28 : Schéma représentant les différentes modifications post-traductionnelles de l'ubiquitine</i> | <i>78</i> |
| <i>Figure 29 : Schéma représentant les différentes phases du cycle cellulaire.....</i> | <i>82</i> |
| <i>Figure 30 : Schéma représentant les différentes phases successives de la mitose.....</i> | <i>83</i> |
| <i>Figure 31 : Schéma simplifié des centrosomes et du réseau de microtubules en métaphase.....</i> | <i>84</i> |
| <i>Figure 32 : Vue d'ensemble du processus de cytokinèse.....</i> | <i>87</i> |
| <i>Figure 33 : Composition des protéines du fuseau central et leur régulation en début d'anaphase.....</i> | <i>90</i> |
| <i>Figure 34 : Formation d'un gradient de RHOA activée au niveau de la région équatoriale centrale.....</i> | <i>93</i> |
| <i>Figure 35 : Voies activées par RHOA-GTP afin de stimuler la formation de l'anneau acto-myosique, sa contraction et son ancrage à la membrane plasmique.....</i> | <i>95</i> |
| <i>Figure 36 : Structure du pont intercellulaire et du midbody.....</i> | <i>98</i> |
| <i>Figure 37 : Cartographie schématique du pont intercellulaire et du midbody</i> | <i>99</i> |
| <i>Figure 38 : Schéma représentant les différents types d'interaction permettant la structuration du midbody et la stabilité du pont intercellulaire.....</i> | <i>102</i> |
| <i>Figure 39 : Seconde ingression et filaments de 17 nm en fin de processus de maturation du pont intercellulaire</i> | <i>104</i> |
| <i>Figure 40 : Inhibition de la polymérisation de l'actine et formation de la seconde ingression par le trafic vésiculaire après la formation et la stabilisation du pont intercellulaire.....</i> | <i>107</i> |
| <i>Figure 41 : Tableau récapitulatif des différentes protéines ESCRT et de leurs domaines associés à l'exception des ESCRT-0.....</i> | <i>110</i> |
| <i>Figure 42 : Les ESCRT-III adoptent différentes formes.....</i> | <i>111</i> |
| <i>Figure 43 : Schéma représentant l'abscission catalysée par la machinerie ESCRT.....</i> | <i>113</i> |
| <i>Figure 44 : Le point de contrôle « NoCut ».....</i> | <i>116</i> |
| <i>Figure 45 : Le pont intercellulaire et l'ubiquitine</i> | <i>121</i> |
| <i>Figure 46 : Domaines fonctionnels et localisation de CEP55 au midbody</i> | <i>127</i> |
| <i>Figure 47 : Interaction entre CEP55 et ALIX/TSG101</i> | <i>129</i> |

| | |
|--|------------|
| <i>Figure 48 : Domaines fonctionnels de ALIX et de TSG101.....</i> | <i>131</i> |
| <i>Figure 49 : CEP55 est impliquée dans l'intégrité du midbody.....</i> | <i>134</i> |
| <i>Figure 50 : CEP55 et le trafic vésiculaire.....</i> | <i>136</i> |
| <i>Figure 51 : CEP55 est régulée par des événements de phosphorylation et d'isomérisation dans les phases précoces de la mitose.....</i> | <i>137</i> |
| <i>Figure 52 : PLK1 inhibe le recrutement précoce de CEP55 au midbody ce qui permet une coordination temporelle entre la mitose et l'abscission</i> | <i>139</i> |
| <i>Figure 53 : Les protéines MTMR3 et MTMR4 jouent un rôle crucial dans l'abscission en régulant le recrutement de CEP55 au midbody en mitose.....</i> | <i>141</i> |
| <i>Figure 54 : Mécanisme de formation d'un syncytium dans les cellules germinales par l'inhibition de l'interaction CEP55/ALIX -TSG101</i> | <i>143</i> |
| <i>Figure 55 : CEP55 est essentiel chez le poisson zèbre</i> | <i>146</i> |
| <i>Figure 56 : L'inactivation du gène CEP55 dans les cellules U20S conduit à des défauts de cytokinèse et de dégradation des midbody remnant.....</i> | <i>168</i> |
| <i>Figure 57 : Étude des propriétés d'interaction des protéines His-Strep CEP55 WT et C440A/C443A avec les partenaires connus de CEP55 au midbody</i> | <i>171</i> |
| <i>Figure 58 : Étude de l'état oligomérique du domaine His-NOAZ de CEP55 et de ses propriétés d'interaction aux tétra-ubiquitines K63 et M1.....</i> | <i>175</i> |
| <i>Figure 59 : Réaction de cis-trans isomérisation des liaisons peptidiques faisant intervenir une proline catalysée par des prolyl cis-trans isomérases.....</i> | <i>177</i> |
| <i>Figure 60 : Analyse des événements de phosphorylation in vitro de la protéine GST-NOAZ de CEP55 par ERK2</i> | <i>180</i> |
| <i>Figure 61 : Études des propriétés d'interaction à l'ubiquitine de la protéine GST-NOAZ après phosphorylation par ERK2 et trans-isomérisation par PIN1.....</i> | <i>182</i> |
| <i>Figure 62 : Modèle des modes d'interaction du domaine NOAZ avec des tétra-ubiquitines M1 et K63.....</i> | <i>191</i> |
| <i>Figure 63 : Modèle moléculaire du gain d'affinité pour les chaînes K63 du domaine NOAZ médié par la phosphorylation du domaine PRR et son isomérisation</i> | <i>192</i> |
| <i>Figure 64 : Modèle de recrutement de CEP55 basé sur une reconnaissance du domaine UBZ à une protéine ubiquitinée X non-identifiée et à MKLP1</i> | <i>201</i> |

PRINCIPALES ABREVIATIONS

ABIN : α 20-binding inhibitor of NF-kappa b activation
ALIX : ALG-2 interacting protein X
AMSH : associated molecule with the SH3-domain of STAM
APC/C : anaphase promoting complex/cyclosome
ARF6 : ADP-ribosylation factor 6
ATP : adénosine triphosphate
BRUCE : BIR repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme
CC : coiled-coil
CDK : cyclin dependant kinase
CEP55 : centrosomal protein 55 KDa
CHMP : charged multivesicular body protein
CPC : chromosomal passenger complex
DDM : dodecyl maltoside
DTT : dithiothreitol
DUB : deubiquitinase
EABR : ESCRT and ALIX binding region
ECT-2 : epithelial cell transforming 2
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK2 : extracellular signal-regulated kinase 2
ESCRT : endosomal sorting complexes required for transport
FAAP20 : fanconi anemia core complex-associated protein 20
FIP3 : Rab11 family-interacting protein 3
GAP : GTPase-activating protein
GEF : guanine nucleotide exchange factor
GFP : green fluorescent protein
GST : glutathione S-transferase
HDAC6 : histone deacetylase 6
HECT : homologous to the E6AP carboxyl terminus
HOIL-1 : heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1
K.O : knock-out
KIF : kinesin family member
LUBAC : linear ubiquitin chain assembly complex
MgcRacGAP : male germ cell RacGAP
MKLP-1 : mitotic kinesin-like protein 1
MR : midbody remnant
MTMR3-4 : myotubularin-related protein 3-4
NBR1 : neighbor of BRCA1 gene 1 protein
NDP52 : nuclear dot protein 52
NEMO : nuclear factor- κ B essential modulator
NF- κ B : nuclear factor- κ B
NOA/UBAN : NEMO-OPTINEURIN-ABIN/ Ubiquitin binding in Abin and NEMO

NZF : NPL4 zinc finger
OTU : ovarian tumour proteases
PDB : protein data bank
PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase
PIN1 : peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
PLK1 : polo-like kinase 1
POL η : polymerase η
PRC1 : protein regulator of cytokinesis 1
PRR : proline rich region
RAP80 : receptor-associated protein 80
RHOA : ras homolog gene family member a
RING : really interesting new gene
RMN : résonance magnétique nucléaire
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEPT : septin
siRNA : small interfering RNA
SNARE : soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
T-SNARE : target-soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
TAB2 : TAK1-Binding Protein 2
TAX1BP1 : TAX1 binding protein 1
TCEP : tris (2-carboxyethyl) phosphine
TEX14 : testis expressed gene 14
TRAF6 : tnf receptor associated factor 6
TSG101 : tumor susceptibility gene 101
Ub : ubiquitin
UBD : ubiquitin binding domain
UBP : ubiquitin-specific processing protease
UBPY : ubiquitin isopeptidase Y
UBZ : ubiquitin binding zinc-finger
UEV : UBC E2 variant
UIM : ubiquitin-interacting motif
USP : ubiquitin-specific protease
V-SNARE : vesicle-soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
VAMP8 : vesicle associated membrane protein 8
VEGF-A : vascular endothelial growth factor a
VPS : Vacuolar protein-sorting-associated protein
WRNIP1 : Werner helicase interacting protein 1
WT : wild-type, sauvage
ZF : zinc-finger

INTRODUCTION

Chapitre 1 : la signalisation liée à l'ubiquitine

PREAMBULE

Les modifications post-traductionnelles consistent en la modification d'une protéine cible par l'addition d'un groupement chimique fonctionnel, une modification chimique d'acides aminés, une coupure protéolytique ou l'attachement covalent de peptides ou de protéines. Elles constituent un moyen de régulation cellulaire efficace en modulant l'activité de la protéine modifiée dans les plus brefs délais si on le compare par exemple à un mode de régulation génique classique. En effet, ce second type de régulation faisant intervenir la transcription d'un gène cible, la maturation de l'acide ribonucléique (ARN) en ARN messager, sa translocation vers le cytoplasme (pour des cellules eucaryotes) et finalement sa traduction, prend une durée totale d'environ 4 h. En considérant que les modifications post-traductionnelles sont souvent réversibles et catalysées enzymatiquement, elles représentent un moyen de régulation protéique rapide, contrôlé dans le temps et hautement dynamique.

L'ubiquitination, une modification post-traductionnelle consistant en la liaison covalente d'une protéine d'ubiquitine sur la protéine cible fut mise en évidence dans un contexte de recherche des mécanismes de dégradation protéique.

La première découverte importante fut d'abord réalisée en 1942 lorsque Rudolph Schoenheimer montra que les protéines étaient dégradées et renouvelées dans la cellule sans en comprendre le (ou les) mécanisme(s) sous-jacent(s) [1]. De 1953 à 1966 on pensa avoir identifié cette machinerie protéolytique quand Christian de Duve et son équipe découvrirent le lysosome et la voie de dégradation lysosomale [2, 3]. Cependant le mécanisme de dégradation lysosomal - impliquant de petites portions du cytoplasme qui contiennent une petite quantité de chaque protéine cytosolique - ne permettait notamment pas d'expliquer comment certains substrats étaient spécifiquement protéolysés dans la cellule.

Ceci a conduit une partie de la communauté scientifique à continuer ses investigations sur les différents mécanismes de dégradation protéique et en 1977, Brian Poole prouva finalement, en utilisant des inhibiteurs lysosomaux, que la cellule disposait également d'un système de protéolyse indépendant des lysosomes [4]. De plus, Etlinger et Goldberg montrèrent dans le même temps l'existence dans les réticulocytes - cellules qui sont dépourvues de lysosome dans un état différencié - qu'il existait un système dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP) permettant la dégradation d'hémoglobines anormales [5].

En 1978, Aaron Ciechanover sous la tutelle de Avram Hershko tentant de caractériser cette protéase publia un article pionnier dans *Biochemical and Biophysical Research Communications* [6]. Les auteurs montrèrent par fractionnement de lysats totaux de réticulocyte sur chromatographie échangeuse d'anions que la dégradation protéique faisait au moins intervenir deux éléments distincts ainsi que de l'ATP. Peu de temps après, en utilisant différentes approches chromatographiques, ils parvinrent à identifier une petite protéine d'environ 9 KDa, qu'ils nommèrent APF1 pour *ATP-dépendant proteolysis factor 1*. En collaboration avec Irwin A. Rose, ils démontrèrent alors qu'une ou plusieurs molécules d'APF1 étaient covalamment attachées à la protéine cible à dégrader par une réaction dépendante de l'ATP [7, 8]. Les auteurs émirent alors l'hypothèse qu'APF1 constituait le signal de dégradation protéolytique de la protéine cible par une protéase jusque-là non identifiée et proposèrent un modèle représenté dans la figure 1.

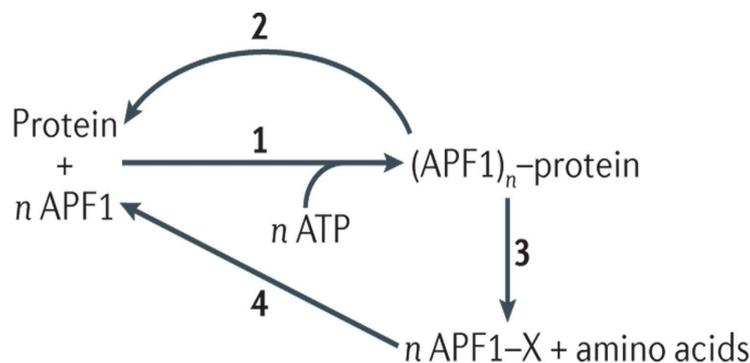


Figure 1 : Modèle proposé de la voie de dégradation dépendante de APF1 (ubiquitine) en 1980

Extrait de [8]. Etape 1 : La protéine cible est conjuguée par n molécules d'APF1 (ubiquitine) par une réaction nécessitant de l'ATP. Etape 2 : APF1 est déconjuguée de la protéine cible libérant n molécules d'APF1 qui peuvent être de nouveau conjuguées à une protéine cible (étape 1). Etape 3 : La protéine cible conjuguée par n molécules d'APF1 est spécifiquement reconnue par une protéase ce qui conduit à la protéolyse de la protéine cible libérant différents acides aminés et des produits de dégradation conjugués à APF1 (X représente une lysine ou un court peptide). Etape 4 : n molécules d'APF1 sont libérées par une amidase permettant à APF1 de se conjuguer de nouveau à une protéine cible (étape 1).

Durant cette même année, ils découvrirent avec une autre équipe indépendante qu'APF1 était en fait l'ubiquitine [9, 10], une protéine déjà décrite mais présentant jusque-là une fonction inconnue. Il avait uniquement été observé que cette protéine était liée de façon covalente à la lysine des histones 2A et 2B [11]. Il fut d'ailleurs découvert bien plus tard que la modification des histones par l'ubiquitine était impliquée dans la répression génique [12] et faisait partie d'un code de régulation génique beaucoup plus vaste appelé « code épigénétique ».

Lorsqu'Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin A. Rose proposèrent en 1980 leur modèle basé sur leurs découvertes, ils ne s'imaginaient pas que cela leur vaudrait le prix Nobel de Chimie 24 années plus tard. Leur modèle s'avéra exact et ne se limitait pas uniquement aux réticulocytes. Il apparut en effet qu'il était ubiquitaire et extrêmement conservé dans l'ensemble des cellules eucaryotes [13]. De plus, ils montrèrent suite à leur première découverte que la réaction de conjugaison d'APF1 ou ubiquitination était catalysée enzymatiquement [14]. On découvrit ultérieurement que c'était également le cas de la réaction de déconjugaison appelée déubiquitination. En outre, la protéase reconnaissant spécifiquement la protéine cible ubiquitinée fut finalement identifiée comme étant le protéasome 26S, un complexe protéolytique qui avait précédemment été découvert sans fonction assignée [15, 16].

Une autre avancée majeure dans le domaine de l'ubiquitine fut réalisée au milieu des années 90 lorsque l'on réalisa qu'il existait en fait différents types de chaînes d'ubiquitine [17] qui ne conduisent pas nécessairement à la reconnaissance de la protéine cible par le protéasome 26S et à sa dégradation [18]. Ces différents types de chaînes d'ubiquitine sont reconnus spécifiquement par une grande diversité de protéines de reconnaissance à l'ubiquitine appelés récepteur à l'ubiquitine via des domaines d'interaction à l'ubiquitine (UBD pour *Ubiquitin Binding Domain*). Ainsi en fonction du type de chaîne d'ubiquitine conjugué à la protéine cible, le destin de cette dernière sera différent définissant « le code de l'ubiquitine ».

Aujourd'hui, le système lié à l'ubiquitine a été montré comme étant impliqué dans la majorité des processus cellulaires et il a été estimé à plus de 5000 le nombre de protéines qui en font partie [19, 20].

Ironiquement, alors que dans les années 80 Aaron Ciechanover et Avram Hershko choisirent de travailler sur des cellules dépourvues de lysosomes afin de mettre en évidence

un nouveau mécanisme de protéolyse non lysosomal, leur découverte permit de montrer bien des années plus tard une implication de l'ubiquitine également dans la voie de dégradation lysosomale [21, 22].

Dans ce chapitre consacré au système de l'ubiquitine, je décrirai les principes de la réaction d'ubiquitination, les enzymes impliquées, ainsi que la base structurale de l'interaction non covalente de l'ubiquitine par les UBDs. Un accent particulier sera mis sur les UBDs de type zinc-finger. J'aborderai finalement l'aspect fonctionnel de l'ubiquitine au sein du code de l'ubiquitine et les avancées récentes qui montrent une expansion fonctionnelle de celui-ci.

I) L'ubiquitination et les enzymes impliquées

A. Principe de l'ubiquitination

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés. L'ubiquitination consiste en l'addition soit d'une simple protéine d'ubiquitine (mono-ubiquitination), soit d'une chaîne de poly-ubiquitine (poly-ubiquitination) sur une protéine cible. Elle est caractérisée par la formation d'une liaison isopeptidique entre le groupement carboxylique de la glycine 76 de l'ubiquitine et généralement le groupement ϵNH_2 d'une lysine de la protéine modifiée (figure 2). Cependant, il a également été décrit dans de rares cas des types d'ubiquitination faisant intervenir la glycine 76 de l'ubiquitine et le groupement amine C-terminal de la protéine cible [23], ainsi que les groupements hydroxyles (OH) des sérines et thréonines et du groupement sulfhydrile (SH) de la cystéine [24, 25].

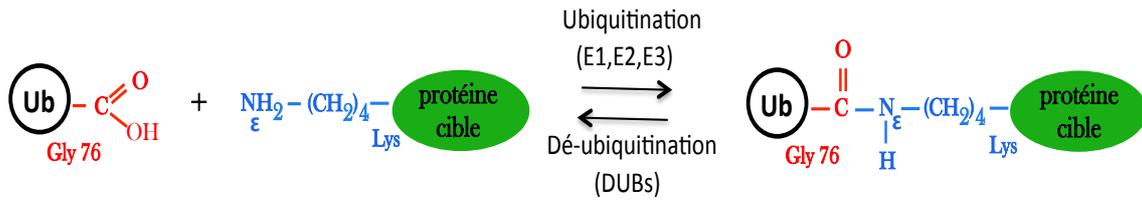


Figure 2 : Vue schématique de la réaction de mono-ubiquitination

La réaction de mono-ubiquitination est catalysée par des enzymes E1, E2 et E3 et conduit à la liaison covalente entre le groupement carboxylique de la glycine 76 de l'ubiquitine et le groupement ϵ NH₂ d'une lysine de la protéine cible. La réaction inverse est catalysée par des déubiquitinases (DUBs).

L'ubiquitination est catalysée par l'action coordonnée des enzymes d'activation (E1), de conjugaison (E2) et de ligation (E3) de l'ubiquitine [8, 26]. La réaction de déubiquitination est catalysée par des déubiquitinases (DUB) [27]. Ces enzymes ainsi que le principe de la catalyse seront détaillés dans les paragraphes suivants.

Dans le cas de la poly-ubiquitination, chaque molécule d'ubiquitine peut se lier par sa glycine C-terminale, aux 7 différents résidus lysine de l'ubiquitine précédente (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) [28]. Il a également été décrit des chaînes de poly-ubiquitines linéaires (ou M1) pour lesquelles le résidu C-terminal d'une ubiquitine est lié au résidu N-terminal de l'ubiquitine précédente [29].

Au sein de la chaîne d'ubiquitine, la molécule d'ubiquitine qui contient la lysine ou la méthionine 1 modifiée est, par convention, appelée ubiquitine proximale alors que celle qui est attachée de façon covalente par sa glycine C-terminale à l'ubiquitine proximale est dénommée ubiquitine distale. Les chaînes d'ubiquitine sont de longueur variable et il a été observé qu'elles peuvent aller de 2 à une dizaine de molécules d'ubiquitine dans la cellule.

B. Les enzymes de synthèse de l'ubiquitine

Premièrement, l'ubiquitine est activée par les enzymes E1 par une réaction dépendante de l'ATP (figure 3). Cela entraîne la formation d'une liaison thioester entre la cystéine catalytique de l'E1 et le groupement carboxylique de la glycine 76 de l'ubiquitine. Dans une seconde étape, les enzymes E1 transfèrent l'ubiquitine aux enzymes de conjugaison E2 par une liaison thioester. Enfin les E3-ligases qui reconnaissent la protéine substrat et l'E2 permettent de faciliter le transfert de l'ubiquitine sur la lysine d'une protéine cible selon un processus appelé initiation. Dans le cas des protéines poly-ubiquitinées, l'E2 est dissociée de

l'E3 et est remplacée par une nouvelle E2 conjuguée à l'ubiquitine. L'ubiquitine est alors transférée vers la lysine ou la méthionine 1 de l'ubiquitine conjuguée à la protéine cible. Cette étape peut se reproduire autant de fois que nécessaire et s'appelle l'étape d'élongation de la chaîne. Par ailleurs, il a été observé dans différents cas que l'E2 catalysant l'initiation de la chaîne était différente de celle(s) qui catalyse(nt) son élongation.

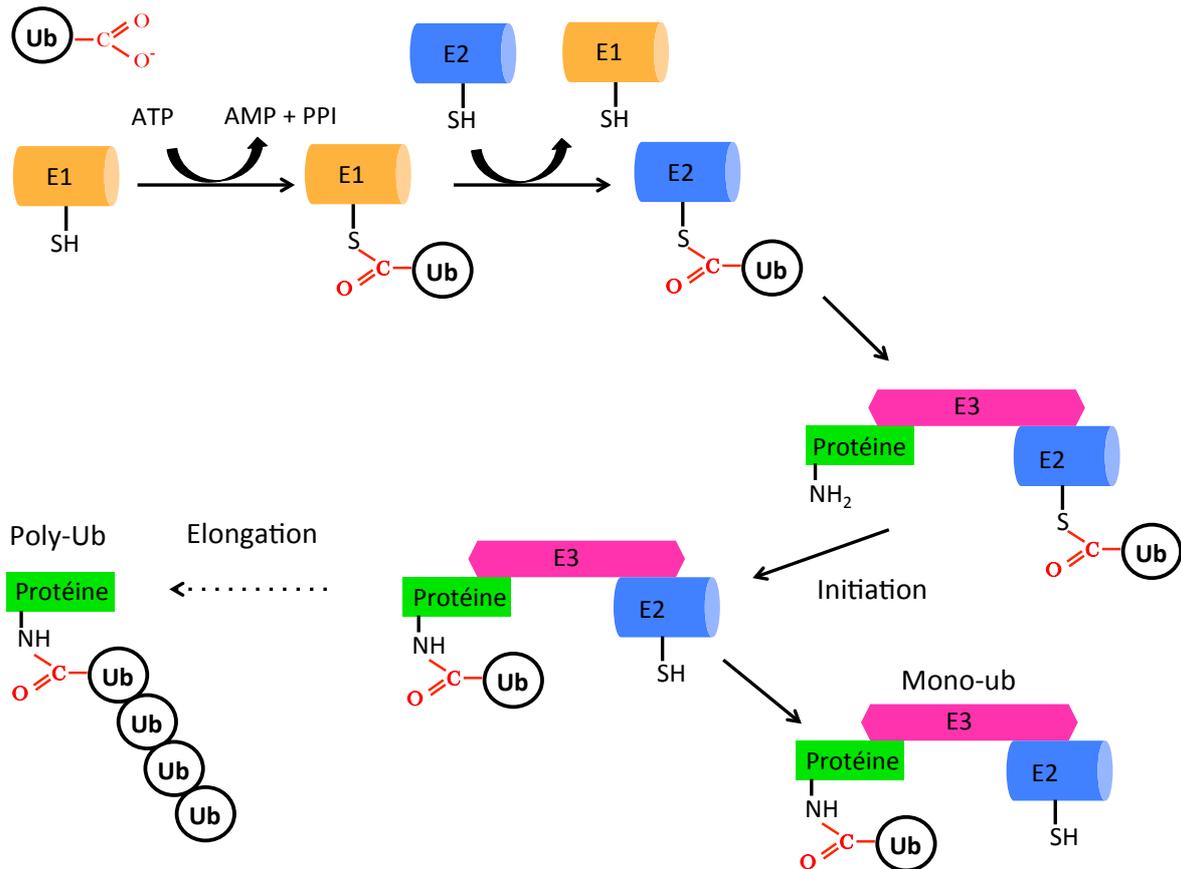


Figure 3 : Machinerie enzymatique de l'assemblage de l'ubiquitine

Les enzymes E1, E2 et E3 catalysent la réaction d'ubiquitination. Ce processus peut conduire à la formation de protéines mono-ubiquitinées ou poly-ubiquitinées par les réactions d'initiation et d'élongation de la chaîne d'ubiquitine respectivement.

Ce sont les E3 qui confèrent la spécificité de reconnaissance du complexe E2/E3 à la protéine substrat alors que la nature du complexe E2/E3, elle, est impliquée dans le type de chaîne lié à la protéine cible (mono-ubiquitine, type de chaîne et longueur de la chaîne). Néanmoins certaines E2 assemblent uniquement un type de chaîne d'ubiquitine comme par exemple L'E2-25K qui catalyse uniquement la polymérisation des chaînes K48. A l'inverse, de nombreuses E3 déterminent à elles seules à la fois la nature du substrat et le type chaîne.

Alors qu'il existe uniquement 2 enzymes E1 (UBA1 et UBA6 pour *ubiquitin-activating enzyme 1 et 6*) chez les vertébrés, il y a une quarantaine d'E2 et plus de 600 E3-ligases soulignant la grande diversité de substrats potentiellement reconnus par ces enzymes [30-32]. Cependant la diversité de ces enzymes n'est pas révélatrice de leur abondance relative dans la cellule. Le rapport de la quantité totale en terme de nombre de copies dans la cellule des E1:E2:E3 est d'environ 1:3:2 dans les cellules HeLa. Dans ces cellules, UBA1 est environ 10 fois plus abondante qu'UBA6 et fait partie d'une des protéines les plus représentées de la cellule [19, 20, 33, 34]. Les E1 sont très actives et il a été montré que dans les cellules HeLa la quasi-totalité d'UBA1 était conjuguée à l'ubiquitine [30].

Il existe 3 familles d'E3-ligases qui catalysent différemment le transfert de l'ubiquitine de l'E2 vers la protéine cible (figure 4).

La première classe appelée RING (*really interesting new gene*) E3 est la plus représentée avec environ 600 membres (figure 4) [32]. Ces enzymes interagissent avec les E2 par leur domaine RING finger, un domaine structuré autour de deux zinc-fingers qui coordinent chacun un atome de zinc. Cette famille catalyse la réaction de transfert sans passer par un intermédiaire covalent. Ils jouent uniquement un rôle d'adaptateur. Le principe de la catalyse des RING E3 est de positionner idéalement l'E2, l'ubiquitine et le substrat de façon à faciliter considérablement la réaction de transfert médiée par l'E2 [35]. Ces E3 reconnaissent ainsi l'E2, la protéine substrat mais également l'ubiquitine par liaison non covalente.

Certaines RING E3 peuvent être actives sous la forme monomérique [36-38], d'autres sous la forme oligomérique [39-41] et enfin d'autres sous la forme de complexes protéiques. Les RING E3-ligases APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosome*) et SCF (*Skp1-Cullin-F-box containing complex*) par exemple sont composées d'un complexe multi-protéique dans lequel le domaine RING d'interaction avec l'E2 est porté par une protéine différente de celle portant le domaine d'interaction à la protéine substrat [42, 43]. Le grand nombre de protéines au sein de ces complexes permet à ces enzymes d'augmenter considérablement la diversité de leurs substrats.

La deuxième classe d'enzyme E3-ligases appelée HECT (*homologous to the E6AP carboxyl terminus*) présente une trentaine de membres (figure 4) [44]. Ces enzymes catalysent le transfert de l'ubiquitine faisant intervenir un intermédiaire covalent sur l'E3 par une réaction de transthiolation entre la cystéine catalytique de l'E2 et celle de l'E3. Dans une deuxième étape, le domaine HECT catalyse le transfert de l'ubiquitine sur le substrat. Cette

famille d'enzymes présente en général un domaine HECT en N-terminal et un domaine d'interaction au substrat indépendant en C-terminal. Le domaine HECT lui-même présente un lobe N-ter (lobe N) qui lie l'E2, connecté par une boucle charnière flexible à un lobe C (lobe C) qui présente la cystéine catalytique [45]. Le lobe N se liant à l'E2 conjuguée entraîne un rapprochement des deux lobes par la boucle flexible conduisant à une reconnaissance d'abord non-covalente du lobe C à l'ubiquitine puis à sa transthioylation. Dans une deuxième étape, la boucle flexible joue également un rôle important en juxtaposant le lobe C à la lysine de la protéine cible et au transfert de l'ubiquitine sur celle-ci [46, 47].

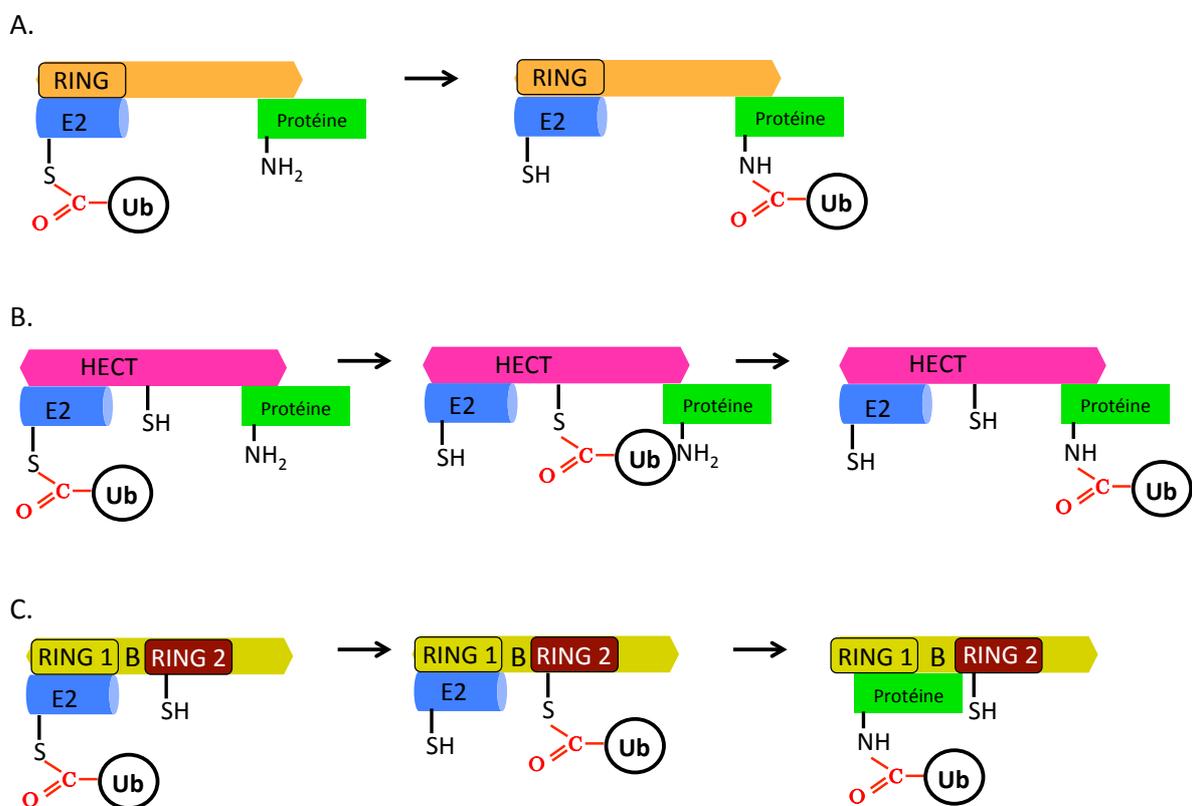


Figure 4 : Les différentes familles d'E3 ligases présentent des mécanismes catalytiques différents

En vert est représentée la protéine cible. Les E3-ligases sont constituées des enzymes de type RING, HECT et RBR. Les domaines RING (A), HECT (B) et RING1 (C) interagissent avec l'E2 de façon non covalente. **A.** Les domaines RING catalysent la réaction de transfert de l'ubiquitine vers la protéine cible en rapprochant l'enzyme E2 de la protéine substrat. **B.** Les domaines HECT catalysent la réaction de transfert de l'ubiquitine à la protéine cible en formant un intermédiaire covalent faisant intervenir une cystéine catalytique présente dans le domaine HECT. **C.** Les domaines RBR catalysent la réaction en formant également un intermédiaire covalent avec l'ubiquitine. Cependant la cystéine catalytique est portée par le domaine RING2.

Finalement, les 14 membres de la famille RBR (*RING-between-RING*) présentent un domaine de type RING (RING1) séparé du domaine RING2 par un domaine *in-between RING* (IBR; figure 4) [32, 48, 49]. Les domaines IBR et RING 2 sont basés sur deux zinc fingers qui ne présentent pas la même structuration que les RING de la famille des RING E3-ligases. Ces enzymes conduisent à un intermédiaire covalent comme pour la famille HECT mais possèdent un domaine RING. Ils sont donc assimilés à une famille intermédiaire entre les deux précédentes familles [50].

La compréhension du mécanisme de transfert de l'ubiquitine vers le substrat pour ces enzymes est limitée à celle de la protéine HOIP (*HOIL-1-interacting protein*) [51, 52]. Cette protéine qui est associée au complexe LUBAC (*linear ubiquitin chain assembly complex*) est la seule ubiquitine ligase connue capable d'assembler des chaînes de poly-ubiquitines linéaires (M1) dans la cellule. Les domaines RING1 se lient à l'E2 conjuguée à l'ubiquitine permettant de rapprocher l'ubiquitine de la cystéine catalytique portée par le RING2. Une réaction de transthiolation permet la formation d'un intermédiaire covalent RING2-ub. L'E2 est dissociée du complexe, permettant à l'E3 de reconnaître la protéine cible et ainsi de transférer l'ubiquitine sur celle-ci.

L'action des enzymes d'assemblage de l'ubiquitine est compensée par celles qui catalysent son désassemblage donnant de la réversibilité au système.

C. Les enzymes de désassemblage de l'ubiquitine

Il existe environ 80 enzymes de désassemblage de l'ubiquitine appelées déubiquitinases (DUBs) chez l'homme [27]. Ces enzymes hydrolysent la liaison (iso-)peptidique entre les différentes molécules d'ubiquitine au sein d'une chaîne de poly-ubiquitine et certaines hydrolysent également celle entre la protéine cible et l'ubiquitine. Ces enzymes sont classées en 5 familles en fonction de la structure de leur domaine catalytique et de leur mécanisme catalytique. Elles sont constituées d'environ 55 DUBs de type USP (*ubiquitin-specific protease*), 14 de type OTU (*ovarian tumour protease*), 10 métallo-enzymes de type JAMM (*JAB/MPN/Mov34*), 4 UCHs (*ubiquitin carboxy (C)-terminal hydrolases*) et 4 DUBs à domaine Josephin [27].

La majorité des déubiquitinasés ne présentent pas de sélectivité catalytique pour un type de chaîne d'ubiquitine. Cependant certaines de ces enzymes clivent avec une sélectivité surprenante certains types de chaînes [53, 54]. Par exemple, OTUB1 (*OTU domain-containing ubiquitin aldehyde-binding protein 1*) clive sélectivement les chaînes K48 [55, 56], AMSH (*associated molecule with the SH3-domain of STAM*) les K63 [57], Cezanne (aussi nommée OTUD7B) les K11 [58] et enfin OTULIN (*OTU deubiquitinase with linear linkage specificity*) les M1 [59, 60]. OTUD3 (*OTU domain-containing protein 3*) clive sélectivement les chaînes K11 et K6 [53] et enfin Trubid clive sélectivement les chaînes K29 et K33 [61, 62].

Les DUBs jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie du pool d'ubiquitine libre dans la cellule.

Tout d'abord, elles permettent de générer le pool de mono-ubiquitine à partir des ubiquitines cellulaires qui sont naturellement traduites sous la forme de chaînes d'ubiquitine linéaires même si les déubiquitinasés directement impliquées ne sont toujours pas connues (Figure 5A). Ensuite elles permettent de recycler les ubiquitines attachées aux protéines ubiquitinylées (figure 5B). Par exemple, la DUB USP14 (*ubiquitin specific protease 14*) est essentielle dans cette fonction [63] et est associée au protéasome 26S permettant de protéger la dégradation de l'ubiquitine par celui-ci.

De plus, les DUBs permettent d'apporter une régulation temporelle à la signalisation liée à l'ubiquitine. Par exemple, la voie NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), qui est notamment impliquée dans l'inflammation, est positivement régulée par les chaînes K63 et M1. Les DUBs CYLD (*cylindromatosis tumor suppressor*), OTULIN et A20 [64] dégradent ces chaînes une fois la voie de signalisation déclenchée permettant d'inhiber cette dernière dont l'activation prolongée peut être néfaste à l'organisme [65].

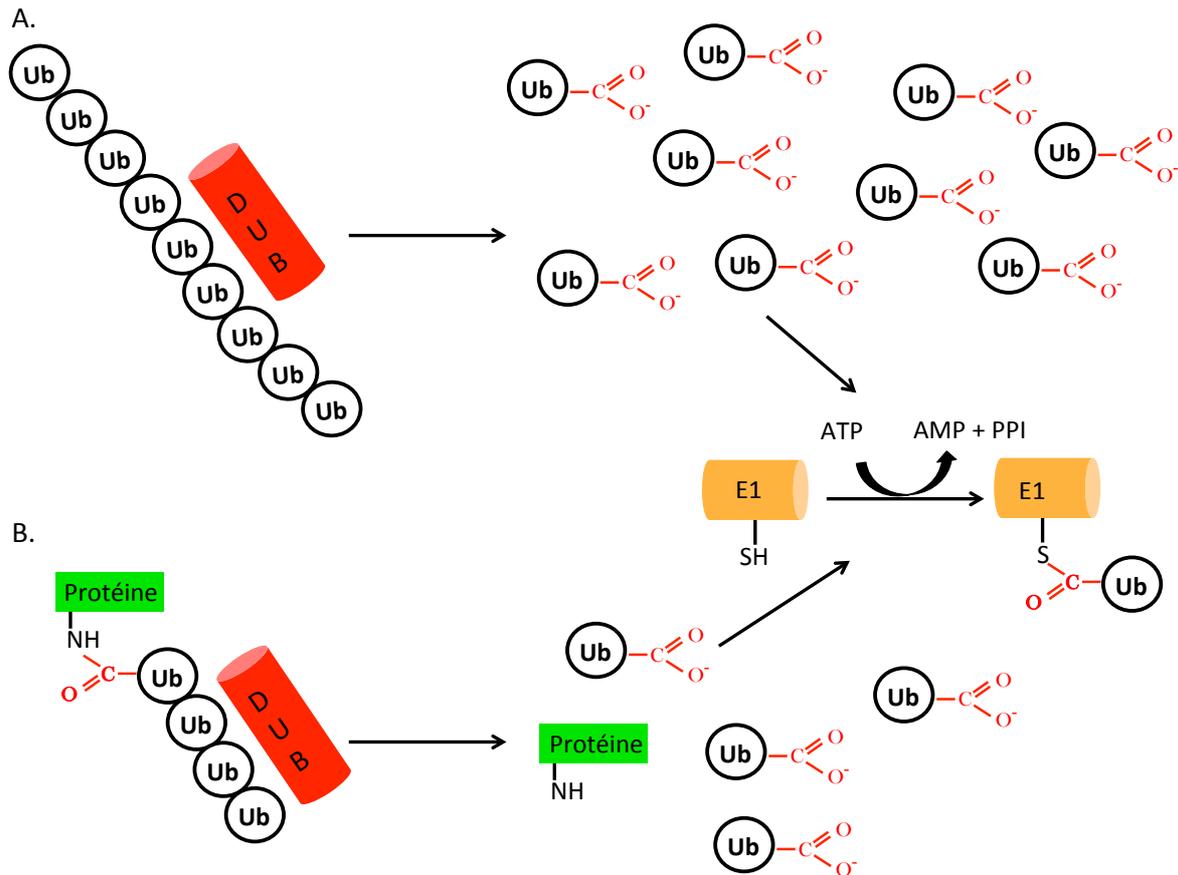


Figure 5 : Les DUBs permettent de générer le pool d'ubiquitine cellulaire

A. De longues chaînes d'ubiquitines linéaires (M1) exprimées par la cellule sont rapidement dégradées par des DUBs dès leur synthèse. **B.** Les ubiquitines conjuguées aux protéines cellulaires sont hydrolysées par les déubiquitinasés libérant des molécules de mono-ubiquitine libre.

Les enzymes d'assemblage de l'ubiquitine peuvent alors ubiquitiner les autres protéines cellulaires.

Enfin ces enzymes sont souvent associées à des E3-ligases et certaines contiennent, en plus de leur domaine catalytique DUB, un domaine catalytique de type E3 [66]. Il a été observé que ces enzymes sont capables de modifier la nature de la chaîne d'ubiquitine directement sur la protéine selon un processus appelé l'édition de chaînes (*chain editing*) (figure 6). L'activité déubiquitinase permet de désassembler la chaîne conduisant à une protéine cible mono-ubiquitinée et l'activité de l'E3 ligase permet ensuite de synthétiser un nouveau type de chaînes sur le substrat. Cela montre qu'une protéine peut à la fois être mono-ubiquitinylée, ou modifiée par différents types de chaînes durant sa durée de vie.

Ce système sophistiqué a par exemple été observé dans la voie NF- κ B dans laquelle A20 qui présente à la fois un domaine E3 et un domaine DUB permet de dégrader les chaînes d'ubiquitine K63 conjuguées à différentes protéines cibles et de les remplacer par des chaînes K48 [67, 68].

De façon surprenante, l'activité DUB de A20 désassemble sélectivement les chaînes K48 *in vitro* [69]. Il fut suggéré que d'autres domaines, qui se lient de façon non covalente à l'ubiquitine et qui sont portés par d'autres protéines, puissent contribuer à la sélectivité de A20 pour les K63 dans cette voie de signalisation.

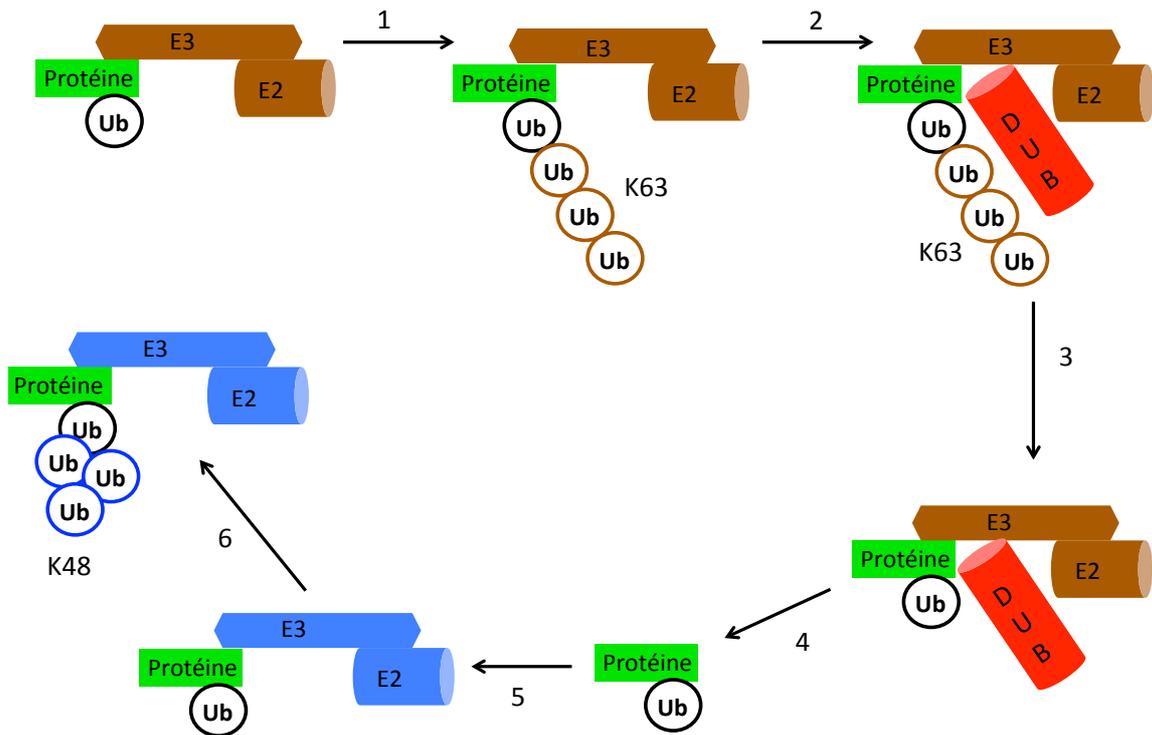


Figure 6 : Principe de l'édition de chaînes par la collaboration des enzymes d'assemblage et désassemblage de l'ubiquitine

Une protéine mono-ubiquitinée est poly-ubiquitinée par un couple E2/E3 synthétisant des chaînes K63 durant l'élongation (1). Une DUB se lie au complexe (2) et hydrolyse la chaîne d'ubiquitine conduisant à la formation d'une protéine mono-ubiquitinée (3), qui se détache du complexe (4). Cette protéine est alors reconnue par un autre couple E2/E3 synthétisant des chaînes K48 (5). La réaction d'élongation est catalysée conduisant finalement à une chaîne K48 (6).

De la même façon qu'A20, un grand nombre de DUBs présentent en plus de leur domaine catalytique des domaines d'interaction non-covalente à l'ubiquitine (UBD) qui jouent un rôle important dans leurs mécanismes catalytiques et dans leurs sélectivités pour un type de chaîne [53]. Je décrirai par la suite la base structurale de reconnaissance de l'ubiquitine par des

domaines UBDs. Celle-ci provient d'abord de la diversité structurale de l'ubiquitine et des chaînes de poly-ubiquitines.

D. Diversité structurale de l'ubiquitine et des chaînes de poly-ubiquitine

L'ubiquitine est une protéine stable qui adopte une conformation globulaire compacte. Elle présente un feuillet β constitué de 5 brins β antiparallèles, une courte hélice 3_{10} et une hélice α [70] (figure 7).

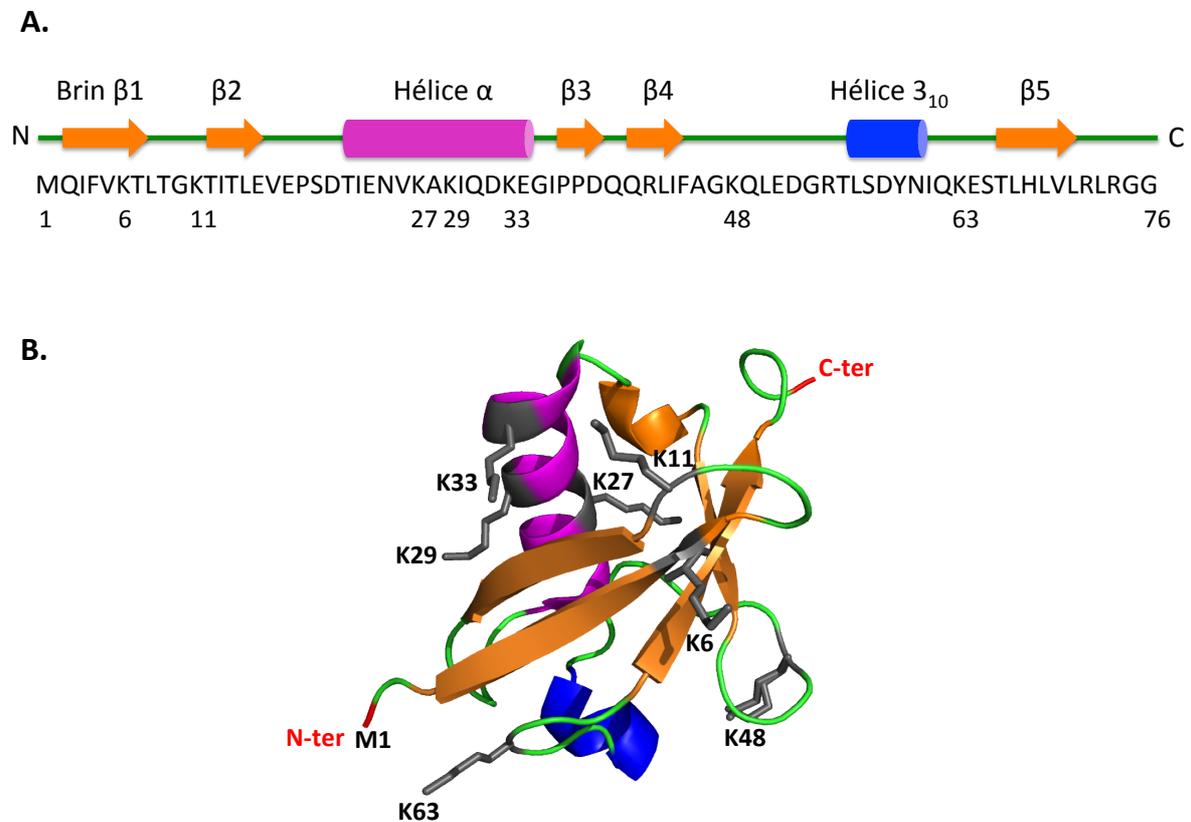


Figure 7 : Structure de l'ubiquitine

A. Structures primaire et secondaire de l'ubiquitine. L'ubiquitine présente un feuillet β constitué de 5 brins β antiparallèles, une hélice α et une hélice 3_{10} . **B.** Structure tertiaire de l'ubiquitine. La protéine contient 7 lysines qui sont impliquées dans la formation de chaînes de poly-ubiquitine de type K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63. La méthionine 1 (M1) est impliquée dans la formation des chaînes linéaires. Tous ces résidus sont exposés au solvant à l'exception de la Lysine 27 qui est enfouie.

Une étude pionnière dans la compréhension des mécanismes d'interaction protéique a permis de mettre en évidence, par résonance magnétique nucléaire (RMN), l'ensemble conformationnel de l'ubiquitine en solution à l'échelle de la microseconde [71]. De façon intéressante, la grande majorité des conformations d'ubiquitine observées au sein des différentes structures cristallines de mono-ubiquitine déposées dans la *Protein Data Bank* (PDB) y sont représentées. L'analyse des conformations de l'ubiquitine révèle une forte rigidité de celle-ci à l'exception de la queue C-terminale comportant la glycine 76 qui est impliquée dans la réaction d'ubiquitination qui, elle, présente une grande flexibilité. Certaines boucles entre les différents motifs structuraux sont également flexibles et particulièrement la boucle $\beta 1/\beta 2$ qui contient la leucine 8. Cette propriété est importante pour la reconnaissance non-covalente de l'ubiquitine par des domaines d'interaction à l'ubiquitine (UBDs) [71].

Quatre zones principales ont été identifiées au sein de l'ubiquitine comme jouant un rôle important notamment parce qu'elles sont impliquées dans la reconnaissance par des UBDs (figure 8). La grande majorité des UBDs reconnaissent une région hydrophobe centrée autour de l'isoleucine 44 (I44 patch) constituée des résidus Ile44, Leu8 (présent dans la boucle flexible $\beta 1/\beta 2$), Val70 et His68 [72-74]. Une autre zone hydrophobe est centrée autour de l'isoleucine 36 (I36 patch) et fait intervenir les résidus Leu71 et Leu73 et dans certains cas la Leu8 [75].

Par ailleurs, l'ubiquitine présente une surface centrée autour de la phénylalanine 4 de l'ubiquitine (F4 patch) contenant les résidus Gln2, Phe4 and Thr12 [76]. De plus, une importance fonctionnelle de la région hydrophile appelée « TEK box » contenant les résidus Thr12, Thr14, Glu34 et les lysines 6 et 11 - lorsque celles-ci ne sont pas covalamment attachées à une molécule d'ubiquitine - a été observée [77]. Enfin la queue C-terminale flexible $^{72}\text{RLRGG}^{76}$ est également impliquée dans des interactions non-covalentes.

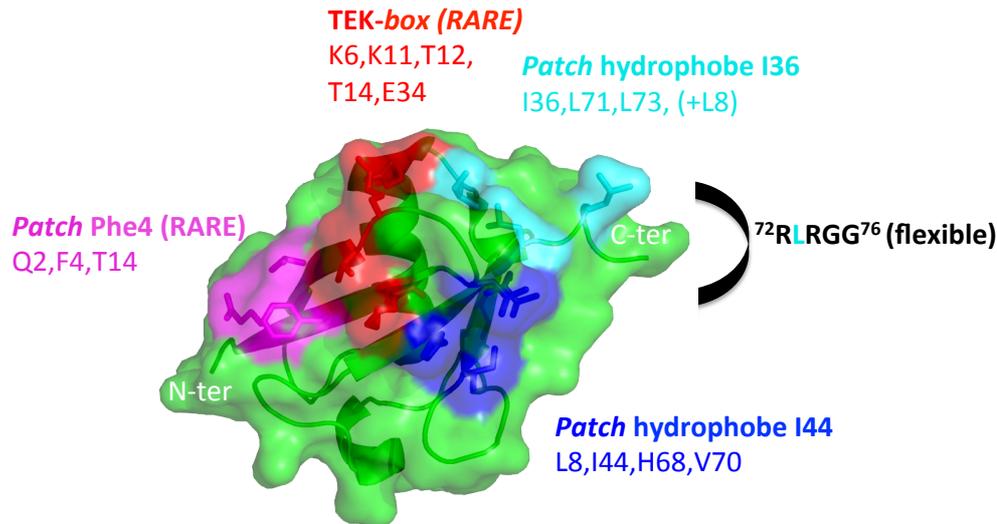


Figure 8 : Zones principales de l'ubiquitine impliquées dans des interactions non-covalentes

Les *patches* centrés sur les résidus I44 (bleu), I36 (cyan), F4 (magenta) et la TEK-Box (rouge) sont mis en évidence. Les *patches* hydrophobes I44 et I36 sont majoritairement impliqués dans des interactions non covalentes. La queue C-terminale portant la glycine 76 présente une grande flexibilité.

Les différents types de chaînes d'ubiquitine présentent des topologies qui diffèrent par leur liaison de polymérisation conduisant à un agencement spatial relatif des molécules d'ubiquitine particulier en fonction du type de chaîne d'ubiquitine. Ainsi, cela entraîne la formation d'un réseau d'interaction non-covalent entre les monomères d'ubiquitine au sein de la même chaîne qui varie selon le type de chaîne. Ces interactions médiées principalement par une interaction des *patches* hydrophobes I44 et I36 jouent un rôle capital dans la conformation adoptée par les différentes chaînes en solution (Figure 9).

Ces chaînes adoptent deux grands types de conformations : une conformation ouverte étendue et une conformation compacte fermée. De façon générale, les données de dynamique moléculaire des chaînes d'ubiquitine suggèrent une forte flexibilité de l'ensemble des chaînes d'ubiquitine. A un degré de complexité supplémentaire, ces propriétés structurales peuvent varier en fonction de la longueur de la chaîne d'ubiquitine.

La première structure cristallographique résolue d'une chaîne d'ubiquitine fut publiée en 1992. Il s'agit d'une chaîne de di-ubiquitine K48 [78]. Plus d'une centaine de structures de poly-ubiquitine ont été déterminées depuis et sont très majoritairement composées des chaînes K48 et K63 [79]. En 2009, la première structure d'une chaîne de di-ubiquitine M1 fut mise en évidence [80] suivie par les structures de di-ubiquitines K6 et K11 un an plus tard [58, 61].

Les premières structures de chaîne K29 [81, 82] et de di-ubiquitine K33 [82, 83] furent résolues plus récemment et aucune structure de chaînes K27 n'a été déterminée expérimentalement à ce jour.

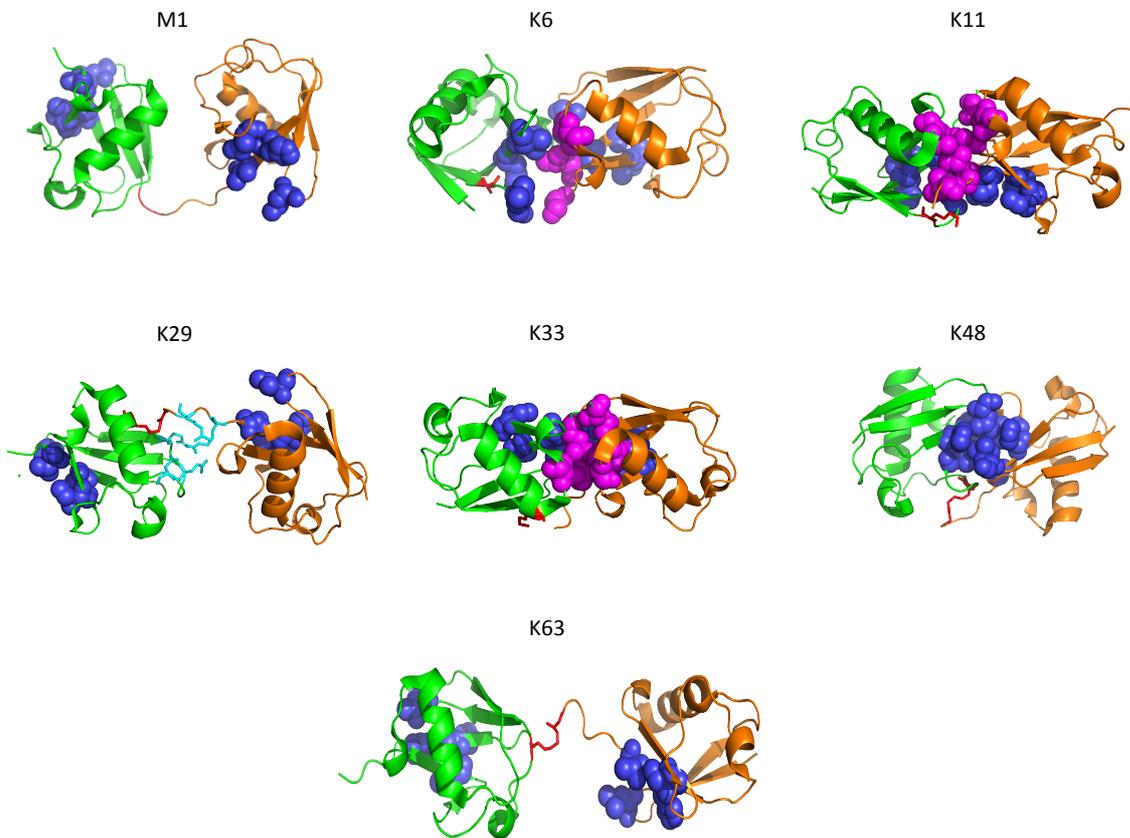


Figure 9 : Diversité structurale des chaînes de di-ubiquitine

Les structures cristallographiques déposées dans la *Protein Data Bank* des di-ubiquitines M1 (3axc), K6 (3zlz), K11 (3nob), K29 (4s22), K33 (4xyz), K48 (3m3j) et K63 (2jf5) sont représentées. Aucune structure de di-ubiquitine K27 n'a été résolue à ce jour. L'ubiquitine proximale et l'ubiquitine distale sont représentées en ruban en vert et en orange respectivement. Le lien de polymérisation est représenté en rouge. Certaines structures sont incomplètes et ne présentent pas le résidu G76 de l'ubiquitine distale. Les patches hydrophobes I44 et I36 sont montrés en sphères bleues et magenta respectivement. Dans le cas de la di-ubiquitine K29 les résidus atypiques polaires ont été représentés en cyan. Les chaînes de di-ubiquitine M1, K29 et K63 adoptent une conformation ouverte étendue alors que les chaînes K6, K11, K33 et K48 adoptent une conformation compacte fermée essentiellement due à des interactions hydrophobes médiées par les patches I44 et I36 entre les monomères d'ubiquitine.

Les chaînes de di-ubiquitine K48 adoptent de façon prédominante une conformation compacte fermée dans des conditions proches de celles physiologiques [78, 84-88] (Figure 9). Les différentes molécules d'ubiquitine interagissent entre elles par le patch hydrophobe I44

empêchant la reconnaissance de cette région par la majorité des UBDs. Cependant des études de dynamique moléculaire montrent que bien que cette conformation fermée soit majoritaire, elle est en équilibre dynamique avec une conformation ouverte [88, 89]. Cette propriété est importante dans la reconnaissance des chaînes K48 par certains UBDs [90]. Les mêmes propriétés ont été observées pour des tétra-ubiquitines K48 suggérant que les tétra-ubiquitines K48 ne sont qu'une répétition de motifs di-ubiquitine [91-94].

Toutes les structures cristallographiques et de RMN résolues de di-ubiquitine, tri-ubiquitine et de tétra-ubiquitine K63 montrent que ces chaînes adoptent une conformation totalement différente des chaînes K48 [80, 85, 95-97]. Elles présentent en effet une conformation étendue ouverte. Les différents monomères d'ubiquitine au sein des chaînes K63 n'interagissent pas de façon non-covalente entre elles. Ceci est dû notamment au fait que le patch hydrophobe I44 est présent du côté opposé à la lysine 63 et que la taille du lien de polymérisation est trop faible pour permettre l'interaction entre les patches de chaque ubiquitine. Ainsi, les patches hydrophobes I44 sont exposés au solvant rendant possible leur interaction avec les UBDs.

Les chaînes linéaires M1 adoptent le même type de conformation ouverte étendue que les chaînes K63 [80]. Ceci est en accord avec le fait que la Méthionine 1 et la lysine 63 sont proches spatialement (figure 9). Cependant ces 2 types de chaînes diffèrent par la nature du lien de polymérisation. Alors que pour les chaînes M1, ce lien est constitué d'une liaison peptidique rigide, il est constitué pour les chaînes K63 d'une liaison iso-peptidique permettant une libre rotation de chaque monomère au sein de la chaîne [80]. Ceci confère ainsi aux chaînes K63 un espace conformationnel plus grand.

La seule structure cristallographique résolue de di-ubiquitine K6 en solution montre une conformation compacte fermée asymétrique qui est différente des chaînes K48 [61]. L'ubiquitine proximale interagit par une partie du patch I44 - uniquement les résidus I44 et V70- au patch hydrophobe Ile 36 de l'ubiquitine distale. Cette interaction asymétrique permet au patch Ile 44 de l'ubiquitine distale d'être libre la rendant accessible aux UBDs.

Les trois structures cristallines de chaînes K11 résolues révèlent des conformations différentes pouvant refléter des contacts dus au réseau cristallin (« crystal packing ») [58, 98, 99]. Néanmoins ces chaînes adoptent une conformation compacte fermée mais, à la différence

des chaînes K48, l'interaction entre les différentes molécules d'ubiquitine n'est pas médiée par le patch I44. L'analyse d'une structure cristalline montre que les monomères d'ubiquitine interagissent de façon symétrique par leur patch hydrophobe Ile 36. De plus, une autre structure montre la présence d'une conformation compacte asymétrique dans laquelle il a été observé une interaction atypique entre les molécules d'ubiquitine. Une certaine accessibilité des patches I44 est globalement observée pour ces chaînes.

L'étude structurale d'une di-ubiquitine K29 a mis en évidence que ce type de chaîne adoptait une conformation ouverte qui est différente de celle observée pour les chaînes K63 et M1. Alors que pour ces dernières aucun contact inter-domaine n'a été observé, il existe une interaction atypique majoritairement polaire faisant intervenir les résidus R42 et R72 de l'ubiquitine distale et les résidus E16, E18 et D21 de l'ubiquitine proximale au sein de la di-ubiquitine K29 [81, 82]. Les patches hydrophobes I44 de chaque ubiquitine sont exposés au solvant.

La di-ubiquitine K33 adopte une conformation compacte fermée dans laquelle les deux monomères interagissent par leur patch hydrophobe Ile 36 contenant également la leucine 8 exposant le patch hydrophobe I44 (à l'exception de la L8) au solvant [82, 83]. De façon surprenante, l'analyse cristalline d'une chaîne de tri-ubiquitine K33 révèle une conformation ouverte complètement différente de celle observée pour la di-ubiquitine [82, 83]. Aucun contact non covalent entre les différentes molécules d'ubiquitine n'y a été observé. Ceci montre notamment l'importance de la longueur de la chaîne d'ubiquitine dans la conformation adoptée par les chaînes d'ubiquitine.

L'analyse de la mono-ubiquitine et des chaînes de poly-ubiquitine révèle une grande diversité structurale de ces nombreux types d'ubiquitine. Elle offre aux récepteurs à l'ubiquitine une large gamme de possibilités de reconnaissance.

II) Les domaines d'interaction aux ubiquitines (UBDs)

Les différents types d'ubiquitine sont reconnus par liaison faible par des récepteurs à l'ubiquitine via des domaines d'interaction aux ubiquitines. Il existe une grande diversité structurale d'UBDs reflétant leur diversité fonctionnelle. Les affinités de ces domaines pour l'ubiquitine *in vitro* peuvent varier du nM au mM (répertoriées dans les revues [72, 100, 101]).

Cependant une particularité des UBDs est que ces domaines présentent dans leur grande majorité une affinité faible pour l'ubiquitine (de l'ordre de la centaine de μM) ce qui rend leur caractérisation parfois difficile. Sur la base de leur structure et du mode de reconnaissance à l'ubiquitine, un grand nombre de familles d'UBDs ont pu être identifiées.

La grande majorité de ces UBDs interagissent avec l'ubiquitine de façon non sélective c'est-à-dire que le domaine ne présente pas intrinsèquement de déterminants permettant de discriminer entre les différents types d'ubiquitine.

A. La classification des domaines UBDs

Je présenterai ici, sur la base d'exemples, les différentes classes d'UBDs - à l'exception des domaines de NEMO et les ZFs qui seront analysés plus en détail - , leur mode de reconnaissance à l'ubiquitine et brièvement des exemples de leurs implications fonctionnelles. Un accent particulier sera mis sur ceux des protéines ALIX et TSG101.

1. Les UBDs tout α

Les domaines UIM, IUIM et DUIM présentent une unique hélice α .

Les domaines UIM (*ubiquitin-interacting motif*) présentent une faible affinité pour l'ubiquitine qui va de la centaine de μM au mM. Ils présentent un mode de reconnaissance basé sur un résidu alanine conservé au sein du motif (LXXAL) qui interagit avec l'Ile44 de l'ubiquitine. Ces domaines sont impliqués dans différentes fonctions [102, 103]. Par exemple l'UIM de S5A (ou RPN10 pour *regulatory particle non-ATPase 10*) fait partie du multi-complexe protéique constituant le protéasome 26S jouant un rôle important dans la dégradation des protéines cibles.

Le domaine IUIM (*inverted UIM*) constitue un domaine UIM inversé. L'hélice α des IUIM présente néanmoins un tour d'hélice supplémentaire qui contribue également à l'interaction avec l'ubiquitine lui conférant une affinité pour l'ubiquitine qui est significativement supérieure à celle des UIM (30 μM). La famille des IUIM est représentée par un unique membre Rabex5 (*Rab5 GDP/GTP exchange factor*) qui est notamment impliqué dans l'endocytose [104, 105].

Les domaines DUIM (*double-sided UIM*) présentent la particularité de se lier simultanément à deux molécules d'ubiquitine. Deux sites d'interaction se faisant face au sein de l'unique hélice α permettent la reconnaissance du patch I44 de chaque ubiquitine. L'UIM de HRS qui appartient au complexe ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) est notamment impliqué dans le tri des endosomes et la formation de corps multi-vésiculaires [106].

Les domaines UBM, MyUb et NOA présentent deux hélices α .

Les domaines UBM (*ubiquitin-binding motif*) sont notamment présents dans la famille des polymérase Y qui jouent un rôle dans la réparation de l'ADN [107]. Ces domaines présentent deux hélices séparées par un coude (Leu-Pro). Ils interagissent avec l'ubiquitine par le patch hydrophobe I44 avec une faible affinité (180 μM).

Le domaine MyUb (*myosin VI ubiquitin-binding domain*) a été décrit récemment comme étant présent dans la Myosine VI qui est notamment impliquée dans l'endocytose et dans l'autophagie [108]. Ce domaine est constitué d'un motif RRL qui est important dans l'interaction avec l'ubiquitine. Le domaine MyUb interagit préférentiellement avec les di-ubiquitines K63 et chaque hélice interagit avec le patch hydrophobe I44 d'une molécule d'ubiquitine. L'affinité du domaine pour ces chaînes est de l'ordre du μM .

Les domaines NOA (*NEMO-OPTINEURIN-ABIN*) sont constitués de deux hélices α chacune portée par une chaîne polypeptidique différente qui se structurent en coiled-coil dimérique. Les domaines NOA sont extrêmement conservés au sein de 5 protéines : NEMO, NRP, ABIN1, ABIN2 et ABIN3. Leur structure détaillée sera abordée plus en détail dans la partie 3A de ce chapitre.

Les UBDs de type UBA, CUE et GAT présentent une structuration similaire de 3 hélices α .

Le premier UBD découvert appartient à la famille UBA (*ubiquitin associated*) qui est bien caractérisée [109]. Par exemple HUWE1 (*HECT, UBA And WWE Domain Containing 1*) qui est une E3-ligase impliquée notamment dans la voie NF- κB en possède un [110]. Ces

domaines sont constitués de trois hélices α qui peuvent interagir avec de la mono-ubiquitine mais également avec des chaînes de poly-ubiquitine en interagissant principalement avec le patch I44 de l'ubiquitine. Des déterminants portés par les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 3$ reconnaissent l'ubiquitine distale, ceux portés par les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ reconnaissent l'ubiquitine proximale. Quatre classes ont été proposées en fonction de la spécificité de ces domaines pour les chaînes d'ubiquitine. Les UBA des protéines hHR23A (*human homolog of Saccharomyces cerevisiae Rad23*) et Mud1 qui appartiennent à la classe I se lient sélectivement aux chaînes K48 [90, 111]. Les UBA de classe II se lient sélectivement aux K63, ceux de type IV se lient de façon non sélective aux chaînes K63 et K48 [112, 113]. Enfin les UBA de type III présentent une structuration identique à celle des UBA mais ne présentent pas de propriétés d'interaction à l'ubiquitine et peuvent donc être plutôt assimilées à des « UBA-like ». Les bases structurales de sélectivité de ces domaines ne sont pas toutes connues. Les données structurales acquises par RMN et par cristallographie montrent que les UBA interagissent avec l'ubiquitine via une orientation de l'UBD proche de celle des domaines CUE.

Les affinités des domaines CUE (*coupling of ubiquitin conjugation to endoplasmic reticulum degradation*) pour la mono-ubiquitine sont d'environ 20 μM pour VPS9 et sont plus faibles pour les autres domaines CUE ($>100 \mu\text{M}$). De façon intéressante, il a été observé que la protéine VPS9 présente la particularité de dimériser, rapprochant spatialement les deux domaines CUE portés par chaque monomère. Ces deux domaines interagissent avec la même ubiquitine au niveau du patch hydrophobe I44 et d'une région contenue entre l'I36 et l'I44 expliquant la meilleure affinité pour la mono-ubiquitine de la famille [114-116]. Ces domaines sont impliqués principalement dans la dégradation des protéines par le protéasome [117].

Les domaines GAT (*GGA and TOM*) interagissent avec le patch I44 de la même ubiquitine par deux sites d'interactions portés par les hélices $\alpha 1/\alpha 2$ et $\alpha 2/\alpha 3$ conférant à ces domaines une affinité de l'ordre de 100 μM pour l'ubiquitine. Ces domaines sont retrouvés dans la famille de protéines CGA qui sont impliquées dans le transport de récepteurs mannose-6-phosphate entre le réseau trans-golgien et les endosomes [118, 119].

Le domaine V de ALIX (*ALG-2 interacting protein X*), une protéine associée au complexe ESCRT, présente une seule chaîne polypeptidique qui comporte 6 longues hélices α (figure 10). Les trois premières et les trois dernières hélices α forment chacune un « coiled-coil » trimérique. Ces deux « coiled-coil » sont séparés par un coude anguleux donnant à la structure une forme en V. Trois études indépendantes montrent que ce domaine interagit avec

l'ubiquitine. Il se lie avec la mono-ubiquitine avec une affinité de l'ordre de 100 μM et une sélectivité de ce domaine pour les chaînes K63 a été observée (9 μM) comparée aux chaînes K48 et M1 (80 μM) [120-122]. Même si la base structurale de cette sélectivité n'a pas été identifiée, des données de mutagenèse montrent que l'interaction avec l'ubiquitine est dépendante du patch hydrophobe I44 de l'ubiquitine et fait intervenir deux triades chargées et polaires sur l'hélice $\alpha 2$ d'ALIX. Par ailleurs, ce domaine est capable d'oligomériser de façon dépendante de son interaction avec l'ubiquitine [122]. De plus il a été montré que ce domaine peut s'auto-ubiquitiner de façon indépendante d'enzymes E3 [122].

Les UBDs de type VHS (*VPS27-HRS-STAM*) portent 8 hélices α qui forment une super-hélice. Ce domaine est présent au sein des protéines du complexe ESCRT-0 constitué de HRS (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) et de STAM (*signal transducing adaptor molecule*) chez l'homme (deux isoformes chez l'homme STAM I et II) et de leurs homologues respectifs chez la levure *VPS27* (*vacuolar protein-sorting-associated protein 27*) et Hse1. L'interaction est médiée par deux sites d'interaction sur la même ubiquitine portés par deux hélices différentes. Une hélice interagit avec le patch hydrophobe I44 alors que la deuxième reconnaît la boucle $\beta 4/\beta 5$ de l'ubiquitine portant notamment la lysine 48 [123, 124]. Ces domaines présentent une faible affinité pour la mono-ubiquitine (200 μM -1mM). Il a cependant été remarqué que ces domaines se lient préférentiellement aux chaînes d'ubiquitine K63 (20 μM) et K48 (40 μM) comparées à de la mono-ubiquitine ou à des chaînes M1 [123-125]. La base structurale de cette sélectivité pour ces chaînes est méconnue mais il est probable qu'un autre site porté par une autre hélice se lie à la deuxième ubiquitine de la chaîne. En outre, des données RMN suggèrent un mode d'interaction différent avec les chaînes K63 et K48 pouvant expliquer la modeste préférence de ces domaines pour les K63 comparée aux K48 [124].

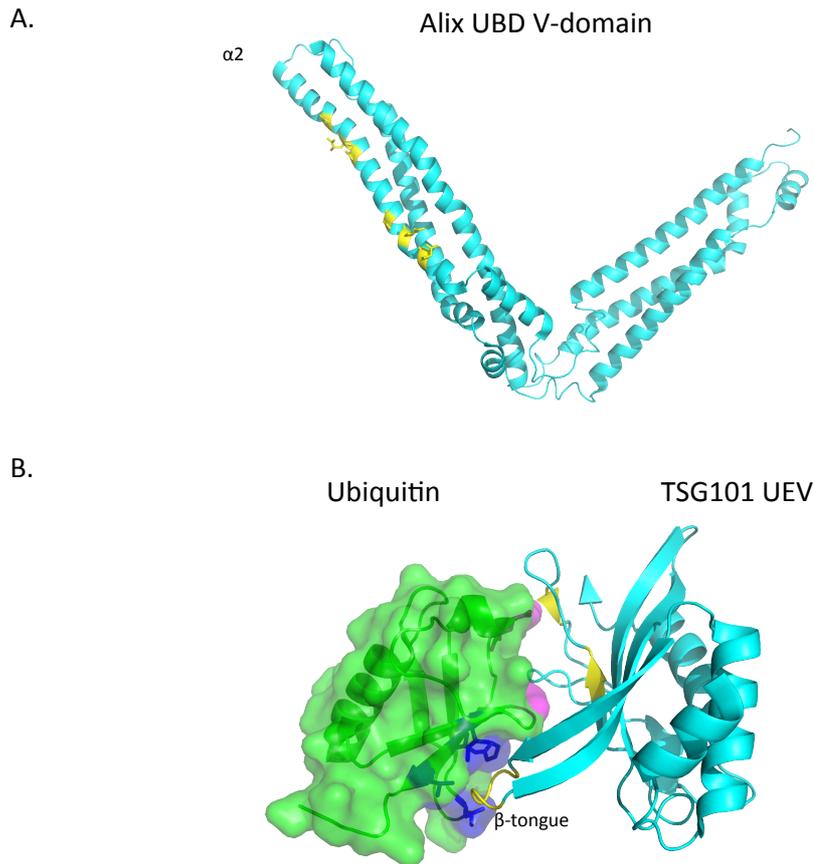


Figure 10 : Les UBDs de ALIX et de TSG101

A. (PDB : 4JJY) Le domaine V de Alix se lie à l'ubiquitine et préférentiellement aux chaînes longues d'ubiquitine K63 même si la base structurale de la reconnaissance n'a pas été établie. L'interaction fait intervenir l'hélice $\alpha 2$. **B.** (PDB : 1S1Q) Le domaine UEV de TSG101 se lie à l'ubiquitine par 3 sites distincts faisant notamment intervenir la reconnaissance de la boucle $\beta 1/ \beta 2$ du patch I44 de l'ubiquitine. En cyan sont représentés les UBDs, en jaune les sites d'interaction avec l'ubiquitine et en vert l'ubiquitine.

2. Les UBDs α/β

Les domaines UBC (*Ubiquitin conjugating*) et UEV (*UBC E2 variant*) sont basés sur une structure de 2 hélices suivies d'un feuillet β de 4 brins antiparallèles, d'une courte hélice α et d'une plus longue hélice α .

Les UBC sont des « UBD » présents dans les enzymes E2. Ces domaines sont considérés comme appartenant aux UBDs par certains, car il a pu être observé que lors de l'élongation de la chaîne de poly-ubiquitine sur une protéine cible, ces domaines interagissent par liaison faible aux ubiquitines dont la glycine C-terminale est déjà impliquée dans une

liaison covalente [26]. Ceci facilite ainsi le processus d'élongation. Il a été observé que le domaine UbcH5C se lie avec l'ubiquitine avec une affinité de 300 μM [126]. Cette interaction fait intervenir le feuillet β de la protéine et le patch I44 de l'ubiquitine.

Les UEV sont des domaines qui présentent la même structure que les UBC mais ne contiennent pas de résidus catalytiques et peuvent donc vraiment être assimilés à des UBDs. TSG101 (*tumor susceptibility gene 101*), une protéine faisant partie du complexe ESCRT-I présente un domaine UEV qui est notamment impliqué dans le trafic vésiculaire. Il se lie à l'ubiquitine avec une faible affinité (500 μM). Ce domaine englobe l'ubiquitine par son feuillet β qui adopte une forme concave dans le complexe (figure 10). Trois régions semblent importantes pour l'interaction. La boucle $\beta 1/\beta 2$ flexible, appelée « β -tongue » par les auteurs, interagit avec le patch I44 de l'ubiquitine. L'extrémité C-terminale du brin $\beta 4$ stabilise le cœur du complexe par contact hydrophobe et enfin la boucle en C-ter du $\beta 4$ reconnaît la glutamine 62 de l'ubiquitine [127].

La famille des UBDs homologues à la Pleckstrine (PH) est caractérisée par une structure de 7 brins β et d'une hélice α C-terminale. On y retrouve le domaine GLUE (*GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45*) de la protéine VPS36 (*Vacuolar protein-sorting-associated protein 36*) noté également EAP45 (*ELL-associated protein of 45 kDa*). Cette protéine appartient au complexe ESCRT II. De façon intéressante, cet UBD a été montré comme interagissant à l'ubiquitine et aux lipides de type phosphoinositide [128]. Il a également été montré que ce domaine se lie à la surface hydrophobe I44 par une région portée à l'opposé de son site d'interaction aux phosphoinositols suggérant que ce domaine peut interagir avec ces partenaires simultanément. Le domaine PRU de Rpn13 (*regulatory particle non-ATPase 13*) appartient au protéasome 26S et n'interagit pas avec les lipides [129]. Ce domaine se lie avec une forte affinité pour les chaînes de poly-ubiquitine K48 (90 nM). Ce domaine reconnaît le patch hydrophobe I44 de l'ubiquitine mais interagit également avec le résidu E49 de l'ubiquitine. Enfin, un troisième site potentiel a été identifié à proximité de la lysine K48 pouvant expliquer la sélectivité de ce domaine pour ces chaînes [130].

Les domaines Jab1 (*Jun activation domain-binding protein 1*)/MPN (*Mpr/Pad1/N-terminal*) sont connus pour être des domaines catalytiques de métalloenzymes Jab1/MPN qui reconnaissent l'ubiquitine de façon covalente et ne sont donc pas considérés comme des domaines UBDs. Néanmoins, un variant de ce domaine ayant perdu le résidu catalytique a été

identifié au sein de la protéine Prp8p. Ce domaine se lie à l'ubiquitine avec une affinité de 380 μM [131]. Des études de mutagenèse suggèrent que ce domaine se lie notamment par le patch I44 de l'ubiquitine. Ce domaine est notamment impliqué dans l'épissage alternatif des ARNs pré-messagers.

Le domaine PFU (*PLAA family ubiquitin binding domain*) de PLAA (*phospholipase A2 activating protein*) est formé de deux feuillets β chacun étant constitué de quatre brins β et de deux hélices α [132]. Cette protéine est impliquée dans la voie de dégradation protéasomale associée au réticulum endoplasmique ERAD (*endoplasmic reticulum associated degradation*). Elle reconnaît l'ubiquitine notamment au niveau du patch hydrophobe I44.

3. Les UBDs tout β

Les domaines SH3 (*SRC homology 3*) sont de petits domaines de 60 acides aminés structurés en tonneau β . Ces domaines d'interaction protéine/protéine sont abondants dans la cellule. Certains sont des UBDs. Ces domaines notamment identifiés dans les protéines Sla1 (*Src like adapter Protein 1*), CIN85 (*Cbl-interacting protein of 85 kDa*), reconnaissent l'ubiquitine au niveau du patch I44 hydrophobe de l'ubiquitine. Cependant même si les déterminants responsables de l'interaction avec l'ubiquitine n'ont pu être identifiés, des données RMN suggèrent que ces domaines présentent des modes d'interaction différents notamment au niveau de la queue C-terminale de l'ubiquitine [133].

Les domaines WD40 présentent une unique chaîne polypeptidique constituée de différents sous-domaines globulaires structurés en feuillets β . Ces différents sous-domaines interagissent entre eux pour former une structure globale du domaine faisant penser à un pore, appelée « β propeller ». Le domaine WD40 de la protéine de levure Doa1 (PLAA chez l'homme) qui est constitué de 6 brins β est capable d'interagir avec l'ubiquitine par le patch hydrophobe I44 de l'ubiquitine. Cette protéine est notamment impliquée dans la voie ERAD. Par ailleurs, un grand nombre d'autres domaines de type WD40 présentent des propriétés d'interaction à l'ubiquitine *in vitro* même si leur implication fonctionnelle n'a pas été déterminée [134].

La majorité des UBDs ne présentent pas de sélectivité d'interaction pour un type de chaîne d'ubiquitine. Cependant, comme nous venons de le voir certains types d'UBDs reconnaissent préférentiellement certains types de chaînes. De plus en plus d'exemples de ces

domaines UBDs ont été identifiés montrant qu'il existe différentes stratégies générales d'interaction sélective des UBDs à un type de chaîne d'ubiquitine.

B. Les principes de la reconnaissance sélective des récepteurs à l'ubiquitine

Les structures d'UBDs sélectifs pour les chaînes K48, K63, M1, K33 et K29 ont été résolues mettant en évidence différentes stratégies principales pour permettre la reconnaissance sélective d'un type de chaîne [76, 81, 82, 90, 135]. Tous les UBDs sélectifs dont la structure a été résolue reconnaissent directement à la fois l'ubiquitine distale et l'ubiquitine proximale de la chaîne.

Une des stratégies principales adoptées par ces UBDs afin de sélectionner un type de chaîne est d'utiliser les propriétés de flexibilité et d'agencement des monomères d'ubiquitine qui varient remarquablement entre les différentes chaînes (stratégie 1).

Une autre stratégie adoptée par les UBDs est de reconnaître l'environnement moléculaire proche du lien de polymérisation qui varie en fonction du type de chaîne (stratégie 2). Ce principe de reconnaissance sélectif est notamment adopté par de nombreuses déubiquitinases.

Des exemples de ces deux stratégies seront illustrés par la suite par les UBDs de NEMO et des Zinc-finger.

Un autre moyen capital qu'ont les protéines réceptrices à l'ubiquitine pour se lier sélectivement à un type de chaîne d'ubiquitine est d'utiliser simultanément différents domaines d'interaction aux ubiquitines par un mécanisme d'avidité. Plusieurs UBDs portés par la même protéine ou au sein d'un complexe protéique peuvent alors chacun se lier de façon concomitante à un monomère d'ubiquitine différent au sein de la même chaîne d'ubiquitine. Ceci peut conduire à une augmentation drastique de l'affinité de la protéine pour l'ubiquitine [100, 136, 137]).

De façon générale, ce mécanisme d'avidité est une des raisons pour lesquelles certains UBDs cruciaux dans certaines fonctions cellulaires présentent des affinités quasiment

indétectables pour l'ubiquitine (500 μ M-1mM) lorsqu'ils sont étudiés de façon isolée *in vitro*. Un exemple extrême qui illustre bien cela est la déubiquitinase OTUD2 (*OTU domain-containing protein 3*). Celle-ci possède un domaine Zinc Finger prédit comme étant un UBD en plus de son domaine catalytique [53]. Des mutations ponctuelles prédites comme étant critiques dans l'interaction à l'ubiquitine sur ce domaine ZF modifient la spécificité de l'enzyme pour les différentes chaînes d'ubiquitine *in vitro*. Ceci suggère fortement que ce domaine ZF est effectivement un UBD. Cependant, l'étude de l'interaction de ce domaine isolé avec l'ubiquitine en utilisant une des techniques actuelles les plus sensibles à savoir la RMN n'a révélée aucun contact ZF/ubiquitine.

De la même façon, les protéines présentant des UBDs interagissent très souvent avec d'autres partenaires par d'autres domaines et l'interaction ubiquitine/UBD n'est présente que pour renforcer la formation du complexe.

Il est intéressant de noter qu'un nombre impressionnant de protéines réceptrices à l'ubiquitine présentent différents UBDs, qu'elles peuvent être capables d'oligomériser et enfin d'interagir avec d'autres récepteurs à l'ubiquitine. Des exemples de ces protéines abondent dans la littérature et certaines sont référencées dans les revues [72, 100, 101].

Dans le cas d'une sélectivité conférée par avidité, les différents UBDs ne sont pas forcément intrinsèquement sélectifs. La sélectivité est conférée par un agencement spatial particulier des différents UBDs qui sélectionne uniquement les types de chaîne d'ubiquitine permettant une interaction multiple. Ainsi, la position des UBDs entre eux de même que la distance entre les molécules d'ubiquitines qui varient en fonction du type de chaîne et de sa longueur sont des paramètres essentiels dans ce mode de reconnaissance. Conceptuellement, ce mécanisme peut conférer de la sélectivité à n'importe quel UBD à partir du moment où celui-ci est placé dans un environnement propice.

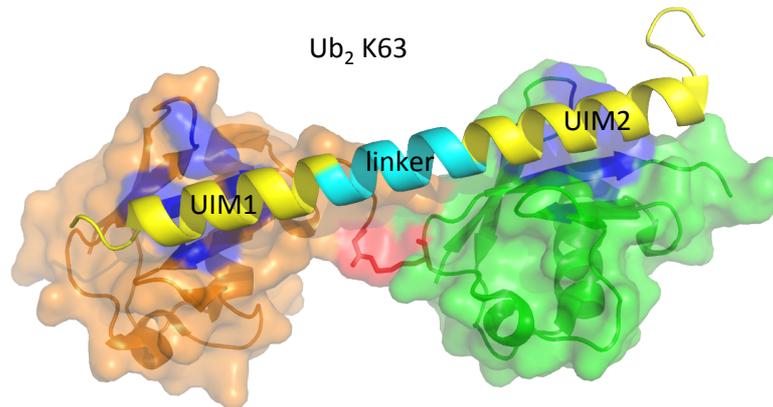


Figure 11 : Exemple du mécanisme de sélectivité conféré par avidité au sein de la protéine RAP80

Les phénomènes de coopérativité entre les UBDs sont fréquents dans la cellule. Cette coopérativité d'interaction peut conférer dans certains cas de la sélectivité d'interaction à un type de chaînes de certaines protéines récepteurs à l'ubiquitine. RAP80 présente deux domaines UIMs séparés par un linker rigide de plusieurs acides aminés qui n'interagit pas avec l'ubiquitine (PDB :3A1Q). Il permet uniquement de disposer les deux UIMs à proximité des patches I44 de chaque ubiquitine de la chaîne K63 permettant une interaction multiple. Cela n'est pas permis pour les chaînes K48 qui présentent une structure compacte expliquant la sélectivité du domaine pour les chaînes K63. En orange et en vert sont représentées l'ubiquitine proximale et distale. En bleu, les patches I44 de l'ubiquitine, en jaune les UBDs UIM et en cyan le linker de RAP80.

La protéine RAP80 (*receptor-associated protein 80*) présente deux domaines UBDs de type UIM qui sont séparés par un « *linker* » de 7 acides aminés (figure 11). Alors que les UIM isolés de RAP80 présentent une affinité pour l'ubiquitine très faible (supérieure à 500 μM) une affinité de 20 μM ainsi qu'une sélectivité d'interaction pour les chaînes de di-ubiquitine K63 ont été observées lorsque les deux domaines sont séparés par leur linker naturel [135, 138]. L'analyse structurale de ce domaine en interaction avec la di-ubiquitine K63 montre que le linker n'est pas directement impliqué dans l'interaction avec la di-ubiquitine mais permet plutôt d'agencer les deux UIMs de sorte que chacun d'eux reconnaisse le patch I44 de chaque ubiquitine (figure 11). Par contre, deux UIMs présents dans la protéine Ataxin 3 séparés par un *linker* plus court de 2 résidus se lieent préférentiellement aux chaînes K48 [135, 138]. Lorsque les linkers des deux protéines ont été interchangés, cela a conduit à une sélectivité des UIMs de RAP80 pour les chaînes K48 et à une sélectivité des UIMs d'Ataxin3 pour les K63 [138]. Ceci montre l'importance du linker et des mécanismes d'avidité dans la reconnaissance sélective des chaînes d'ubiquitines par les UBDs.

La protéine NEMO présente également deux domaines UBDs séparés par un linker qui utilisent également ce mécanisme de sélectivité conféré par avidité.

C. Les UBDs de NEMO

La protéine NEMO (NF- κ B essential modulator), qui a longtemps été étudiée dans mon laboratoire d'accueil, est une protéine cruciale dans la voie de signalisation NF- κ B qui est notamment impliquée dans l'inflammation. Cette protéine dimérique présente deux domaines d'interaction aux ubiquitines qui sont séparés par un linker flexible de 50 acides aminés.

1. Le domaine NOA/UBAN

NEMO partage avec les protéines OPTINEURIN (ou NRP pour *NEMO-related protein*) et les ABIN 1, 2 et 3 (*A20-binding inhibitor of NF-kappaB activation 1,2,3*) un domaine fortement conservé appelé NOA ou UBAN (*Ubiquitin binding in Abin and NEMO*). Ce domaine est bâti sur une structure dimérique « *coiled-coil* » et il se lie sélectivement à des chaînes d'ubiquitine M1 avec une affinité 50 à 100 fois plus forte qu'avec des chaînes K63 malgré leur similarité structurale [76, 139-141].

La détermination structurale du complexe entre le domaine NOA de NEMO et l'ubiquitine M1 fut la première structure d'une di-ubiquitine linéaire en interaction avec un UBD décrite. Elle révèle que le domaine NOA interagit avec la di-ubiquitine M1 par deux sites distincts, chaque site étant porté par un monomère différent du *coiled-coil* (figure 12A). Ceci souligne l'importance d'une structuration dimérique dans la reconnaissance du domaine NOA à ce type d'ubiquitines [76]. Le premier site reconnaît l'ubiquitine distale au niveau du patch hydrophobe I44 et au niveau de la queue C-terminale. Le deuxième site reconnaît également l'ubiquitine distale au niveau de la queue C-terminale par la F363 mais aussi l'ubiquitine distale notamment au niveau de son patch Phe 4 qui est présent dans l'environnement proche du lien de polymérisation entre les deux molécules d'ubiquitines (stratégie 2).

Dans le cas du complexe NOA/Ub₂K63 le deuxième site d'interaction est uniquement constitué de la F363 qui reconnaît la queue C-terminale de l'ubiquitine distale (figure 12B) [140, 142]. Cependant aucun contact n'est observé avec l'ubiquitine proximale.

L'interaction du domaine NOA avec l'ubiquitine proximale des chaînes M1 et non des chaînes K63 explique la sélectivité d'interaction de ce domaine pour les ubiquitines linéaires.

De plus, le domaine NOA de NEMO peut se lier simultanément à 2 molécules d'ubiquitines linéaires différentes de façon symétrique (figure 12C). Une telle interaction semble également être possible pour les di-ubiquitines K63 même si celle-ci n'a pas été observée dans la structure cristalline.

Les structures cristallines des domaines NOA d'OPTNEURIN et d'ABIN2 en interaction avec des chaînes d'ubiquitine linéaires ont été résolues récemment montrant un mode de reconnaissance globalement similaire [143, 144].

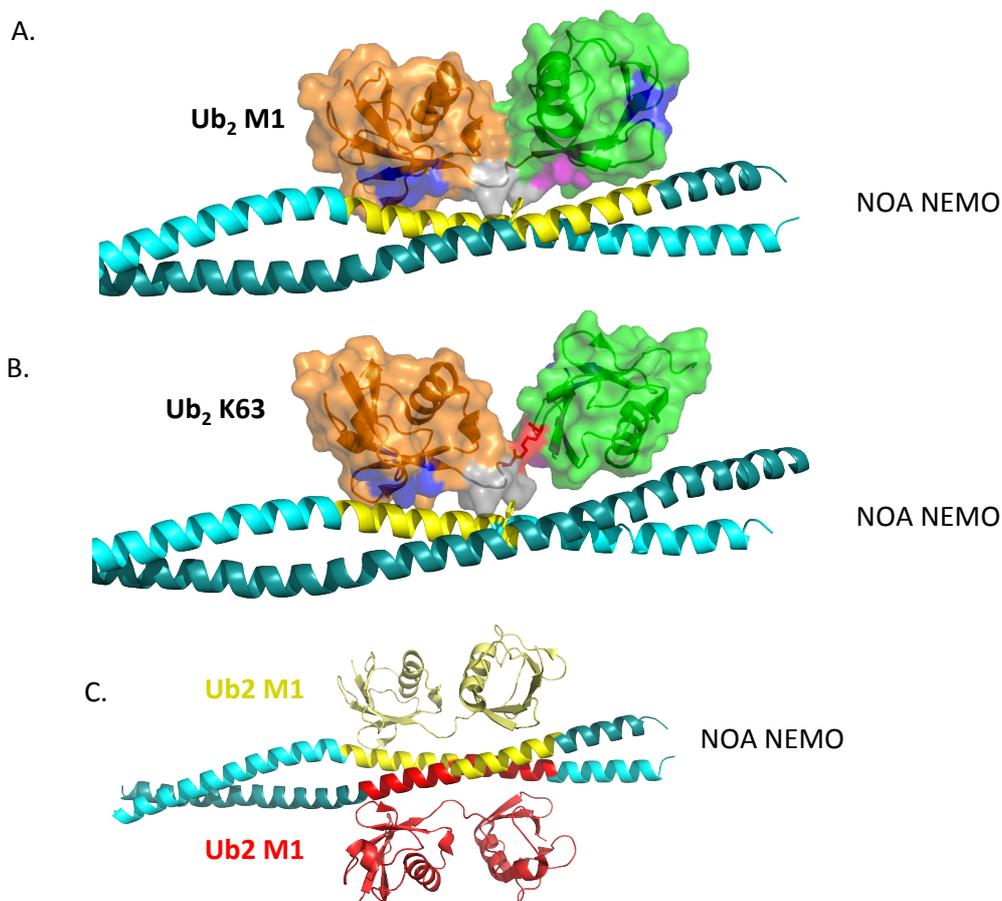


Figure 12 : Le domaine NOA de NEMO

Structures cristallines du NOA de NEMO en interaction avec une di-ubiquitine M1 (A et C, PDB : 2ZVO) et K63 (PDB : 3JSV) (B). Les ubiquitines proximale et distale sont représentées en vert et en orange respectivement. Les patches I44 et Phe4 sont représentés en bleu et en magenta respectivement. En jaune sont représentés les sites d'interaction du domaine NOA avec l'ubiquitine. **A.** Le domaine NOA se lie à l'ubiquitine M1 par 2 sites distincts, chaque site étant porté par une hélice différente du dimère. **B.** Le domaine se lie à l'ubiquitine K63 uniquement par le premier site, aucun contact avec l'ubiquitine proximale n'est observé. Les patches I44 et Phe 4 de l'ubiquitine proximale pointent dans la direction opposée au domaine NOA et ne sont pas visibles sur ce plan. **C.** Le domaine NOA peut se lier à 2 molécules de di-ubiquitine M1 différentes de façon symétrique. Ceci est également potentiellement possible pour les Ub2 K63.

2. Le domaine NOAZ

NEMO présente également un domaine UBD en doigt de zinc (ZF) dans sa partie C-terminale [145, 146]. Comme nous le verrons dans la section suivante, ce domaine interagit avec l'ubiquitine de façon non sélective. De façon intéressante, ce domaine est séparé par un

linker flexible de 50 acides aminés du domaine NOA et il a été montré que les deux domaines interagissaient sélectivement avec de longues chaînes de poly-ubiquitine K63 par un mécanisme de sélectivité conférée par avidité [136, 147]. Il a été proposé que le domaine NOA-linker-ZF forme un domaine bipartite d'interaction aux chaînes K63 appelé NOAZ (figure 13) qui est essentiel à l'activation de la voie NF- κ B. Notons que ce domaine bipartite est également présent dans les protéines Optineurin et ABINs [136].

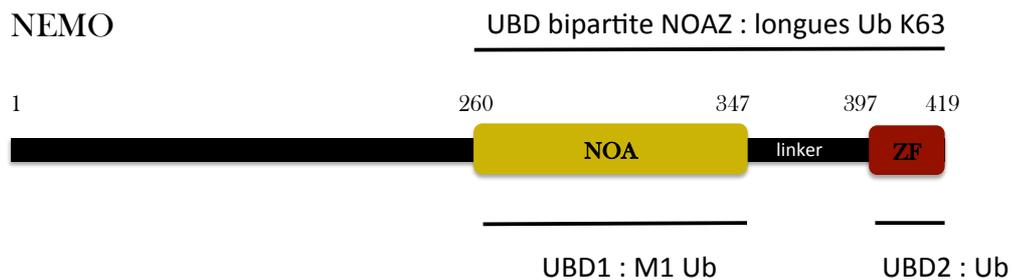


Figure 13 : Schéma de la coopérativité des domaines NOA et ZF de NEMO

La séquence humaine est représentée. Les UBDs de NEMO présentent un mécanisme de sélectivité conféré par avidité. Alors que le domaine NOA se lie préférentiellement aux chaînes M1 et que le domaine ZF se lie de façon non sélective à l'ubiquitine, le domaine NOAZ se lie préférentiellement aux longues chaînes de poly-ubiquitine K63.

Le domaine ZF de NEMO appartient au groupe des UBDs de type Zinc-finger qui appartient lui-même à la grande famille des domaines ZF.

D. Les UBDs bâtis sur une structuration ZF

1. La famille des ZFs : généralités et principe de structuration

Le zinc est le métal le plus représenté dans le corps humain après le fer. La fonction du zinc fut d'abord associée à l'activité enzymatique de métallo-enzymes qui utilisent le zinc pour médier la catalyse [148]. Il ne lui fut accordé que plus tard un rôle dans le repliement et la structuration de domaines [149].

Les ZFs pour Zinc-finger ou domaines en doigt de zinc, sont de petits domaines généralement d'une trentaine d'acides aminés qui se structurent indépendamment en chélatant

un atome de zinc. L'atome de zinc joue uniquement un rôle de structuration dans ces domaines [150]. Le premier domaine ZF fut découvert dans la protéine *xenopus transcription factor IIIA* (TFIIIA) [149].

Le terme « doigt de zinc » provient de la ressemblance de la représentation topologique de ces domaines qui souvent associés en tandem comme les doigts d'une main, chaque doigt correspondant à un domaine zinc finger (figure 14).

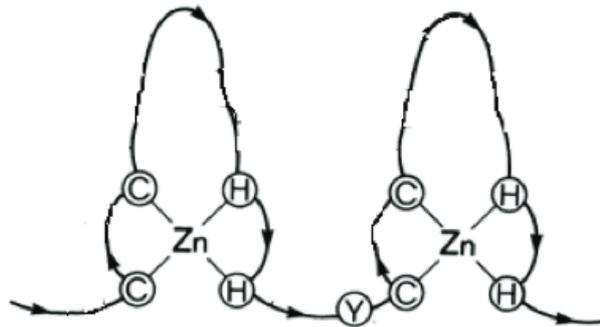


Figure 14 : Représentation topologique de deux ZFs en tandem

Prise de [149]. La chélation du zinc au sein des ZF se fait principalement par un motif de 4 acides aminés constitué de cystéines et d'histidines. Celle-ci fait intervenir une liaison de coordination qui est une liaison covalente dans laquelle les deux électrons partagés dans la liaison proviennent du même atome. La coordination du zinc est tétraédrique et fait intervenir les atomes de soufre SG des cystéines et principalement l'atome d'azote NE2 de l'histidine. Cette liaison de coordination donne aux ZFs des propriétés de structuration indépendante et de forte stabilité.

Les protéines à doigts de zinc sont extrêmement abondantes dans la cellule. Ce motif structural fut d'abord identifié comme étant un motif structural de reconnaissance à l'ADN [149]. Les protéines qui lient le zinc constituent environ 10% du génome humain et sont en grande partie des facteurs de transcription [151]. Parmi les domaines d'interaction à l'ADN, le motif ZF est celui retrouvé le plus fréquemment.

Ces domaines agissent en tandem où chaque domaine ZF se lie à une base de l'ADN conférant une spécificité de reconnaissance de ces domaines pour les différentes séquences d'ADN reconnues [152]. Cependant, de plus en plus d'exemples montrent une implication de ces domaines dans l'interaction avec des ARNs [153], des lipides [154] et des protéines [155].

2. Les outils de classification des ZFs

Les domaines ZFs présentent une très grande diversité structurale et fonctionnelle ce qui rend leur classification complexe.

Un premier outil de classification possible se base sur le nombre et la position au sein de la chaîne polypeptidique des résidus impliqués dans la coordination du zinc [156] ; 85 % des domaines de liaison au zinc seraient basés sur 4 résidus de coordination (même si des domaines à 3 et à plus de 4 résidus de coordination existent). Parmi eux, les principaux types de tétra-coordination seraient de type CCCC (40%), CCHH (27%), CCHC (18%), CHCC (5%), CHCH (3%), HCCC (2%), CCCH (2%), de HHDD (1%) et de HDHH (1%) (figure 15) [151].

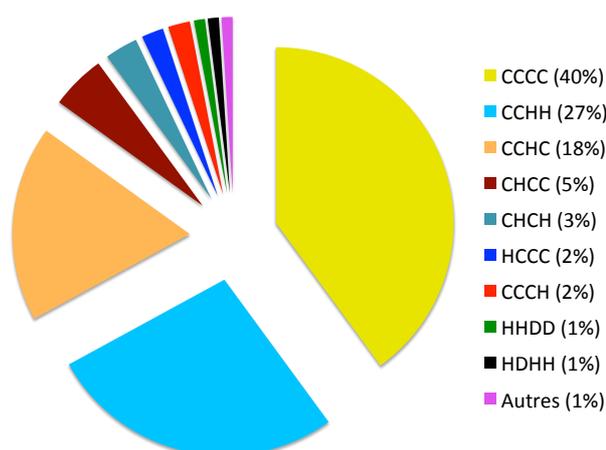


Figure 15 : Estimation de la proportion des types de motifs de tétracoordination en fonction de leur nature et leur position chez l'homme

Selon [151]. Les motifs faisant intervenir 4 résidus de coordination sont majoritaires chez l'homme.

Un second outil de classification fait appel aux motifs structuraux présents dans le domaine ZF. La nature des structures secondaires portant les résidus de coordination ainsi que la position des résidus de coordination au sein de ces structures secondaires sont pris en compte [157]. Sept familles ont été identifiées, la huitième famille étant constituée d'une seule protéine que cette méthode de classification ne permet pas d'inclure (figure 16).

La famille 1 « C2H2-like » est basée sur une topologie $\beta\beta\alpha$ dans laquelle deux résidus de coordination appelés ici ligands sont portés par la partie C-terminale de l'hélice et deux

ligands sont portés par le coude entre les 2 brins β . Les ZFs de la famille 2 « Gag knuckle » présentent deux brins β séparés par un coude suivis par une boucle ou une courte hélice α . Deux ligands N-terminaux sont portés par le coude et les deux autres sont portés par une boucle ou par les extrémités d'une courte hélice. La famille 3 « Treble clef finger » est constituée de ZFs présentant une topologie $\beta\beta\alpha$ pour lesquels deux résidus de coordination du zinc sont portés par le coude mais, à la différence de la famille 1, les deux autres résidus sont portés par la partie N-terminale de l'hélice α . La famille 4 « zinc ribbon » contient des ZFs qui présentent deux feuillets β chacun étant constitué de deux brins β . Les coudes portés par chaque feuillet β comportent les ligands. Les ZFs de la famille 5 « Zn²⁺/Cys6-like finger » dans lesquels deux ligands sont portés par la partie N-terminale d'une hélice et deux autres proviennent d'une boucle. Les ZFs de la famille 6 «TAZ2 domain-like » contiennent au moins 2 hélices α . Un ligand porté par une extrémité C-terminale de chaque hélice α est impliqué dans la coordination du zinc. Enfin, les ZFs de la famille 7 ne présentent pas de structure secondaire définie et les 4 ligands sont portés par des boucles.

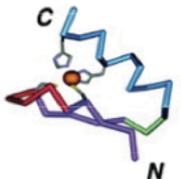
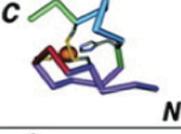
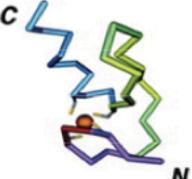
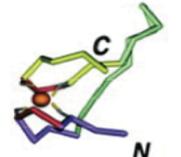
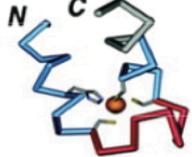
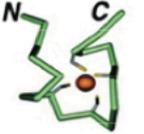
| Fold group | Representative structure | Ligand placement | Members in the alignment |
|-----------------------|---|--|---|
| 1. C2H2 like |  | Two ligands from a knuckle and two more from the C terminus of a helix | lncsA, ltf6A, ltf6D, lzfda, lubbC, 2gliA, lsp2A, lrrmdA, lznfA, 2adrA, laayA, lsp1A, lbhiA, lbboA, 2drpA, lyuiA, lej6C, lklrA, lk2fA, lfv5A, lfu9A, lg73C, ljd5A, lcr9qA, le31A |
| 2. Gag knuckle |  | Two ligands from a knuckle and two more from a short helix or loop | la1tA, la6bB, ldsvA, ldsqA, lfn9A, li3qA |
| 3. Treble clef |  | Two ligands from a knuckle and two more from the N terminus of a helix | lchcA, lborA, ljm7A, ljm7B, lrrmdA, lfbvA, lg25A, lidjb, le4uA, ldcqA, lptqA, lfaqA, lkbeA, le53A, ldvpA, lvfyA, ljocA, lzbdb, lfp0A, lff2A, lfjfn, ljj2T, lee8A, lk3wA, ll2bA, lffyA, lzfoA, lxpaa, 4gata, 2gatA, lgnfA, lb8tA, lmlA, lg47A, lhqcA, lkb6A, lg2rA, len7A, lxbiB, lql0A, la73A, lmhdA, li3qJ, lef4A, llnrY, li3jA, lhc7A, ldgsA, llv3A |
| 4. Zinc ribbon |  | Two ligands each from two knuckles | ljj2Z, ljj2Y, ld0qA, lqypA, li50I, ljj22, li5oD, lqf8A, lffa, li50B, lpta, li50A, laduA, lyuaA, ldfA, lgh9A, lileA, lmeaA, li50L, lzinA, liciA, lma3A, la8hA, ldx8A, lirnA, ldxgA, 2occf, lfrea, lxxkA, lb55A, lf4lA, lgaxA, llnrZ, llnr1, lll0F, le4vA, lzakA, ldl6A, lb71A, lj8fA, lkjzA, lezvE, lrfsA, lg8kB, leg9A, lfqtA |
| 5. Zn2/Cys6 |  | Two ligands from the N terminus of a helix and two more from a loop | ld66A, lzmcC, 2hapC, 2alcA, lco4A |
| 6. TAZ2 domain like |  | Two ligands each from the termini of two helices. | lf81A, lh8cA, lwjbA, ljr3A, ljr3E |
| 7. Zinc binding loops |  | Four ligands from a loop | A) lhsoA, le3jA, li3qC, la5tA, lcyqA1, lgpcA B) lenuA, liq8A, lia9A, lcw0A, lcyqA2, lidjb |

Figure 16 : Classification structurale des ZFs

Extrait de [151]. Les domaines ZFs sont rassemblés en 7 groupes (le 8^{ème} ayant été volontairement omis car étant constitué d'une seule protéine). Le zinc est représenté en sphère orange, les chaînes latérales des résidus de coordination nommés ici ligands sont représentées en gris. En rouge sont représentés les coudes, en bleu les hélices, en violet les brins B et en vert les boucles.

Par ailleurs, un troisième outil de classification fait appel à la nature de son interactant (ADN, ARN, lipide, protéine). Dans le cas des ZF interagissant avec les protéines, le type de protéine peut y être ajouté.

Ainsi, une classe de ZF interagissant avec l'ubiquitine a pu être identifiée. De plus en plus d'études paraissent permettant d'identifier de nouveaux domaines ZF de type UBD et

montrent que ces petits domaines jouent un rôle crucial dans l'activité des protéines récepteurs à l'ubiquitine.

3. La diversité de structures et de modes d'interaction à l'ubiquitine des ZFs UBD

La famille des ZFs UBD est la 2^{ème} famille la plus représentée parmi les UBDs après celle des domaines bâtis en hélice α . On y retrouve 4 différents groupes de ZF classés en fonction de leur structuration et de leur motif de coordination. Les NZFs (*Npl4 zinc finger*), les A20-ZFs (*protein A20 zinc-finger*) et les UBZs (*ubiquitin binding zinc-finger*) correspondent à de petits domaines d'une trentaine de résidus alors que les UBPs sont constitués d'environ 130 résidus. La description de la structure de ces domaines et de leur motif de coordination est abordée ici pour chaque classe d'UBD Zinc-finger et est représentée dans les figures 17 et 23.

a. Les NZFs

Les NZFs présentent un motif de tétra-coordination de type CCCC et présentent 2 brins β courts qui sont séparés par un coude (figure 17). Les deux premières cystéines sont au niveau du coude entre les 2 brins β et les deux autres cystéines de coordination sont portées par une boucle. Les NZFs sont donc des CCCC de type « gag knuckle » (famille 2).

Parmi cette famille on trouve les NZFs présents dans les protéines Npl4 (*Nuclear protein localization protein 4 homolog*), VPS36 (NZF2), TAB2, TAB3 (*TAK1-Binding Protein 2,3*), HOIL1 (*Heme-oxidized IRP2 ubiquitin ligase 1*) de l'E3 ligase LUBAC et de la DUB Trubid [81, 135, 158-160]. De par la nature flexible de la structure des NZFs, ces domaines présentent différents types de reconnaissance à l'ubiquitine et constituent le groupe d'UBDs qui présente la plus grande diversité de domaines sélectifs pour un type de chaînes à ce jour (M1, K63, K29, K33).

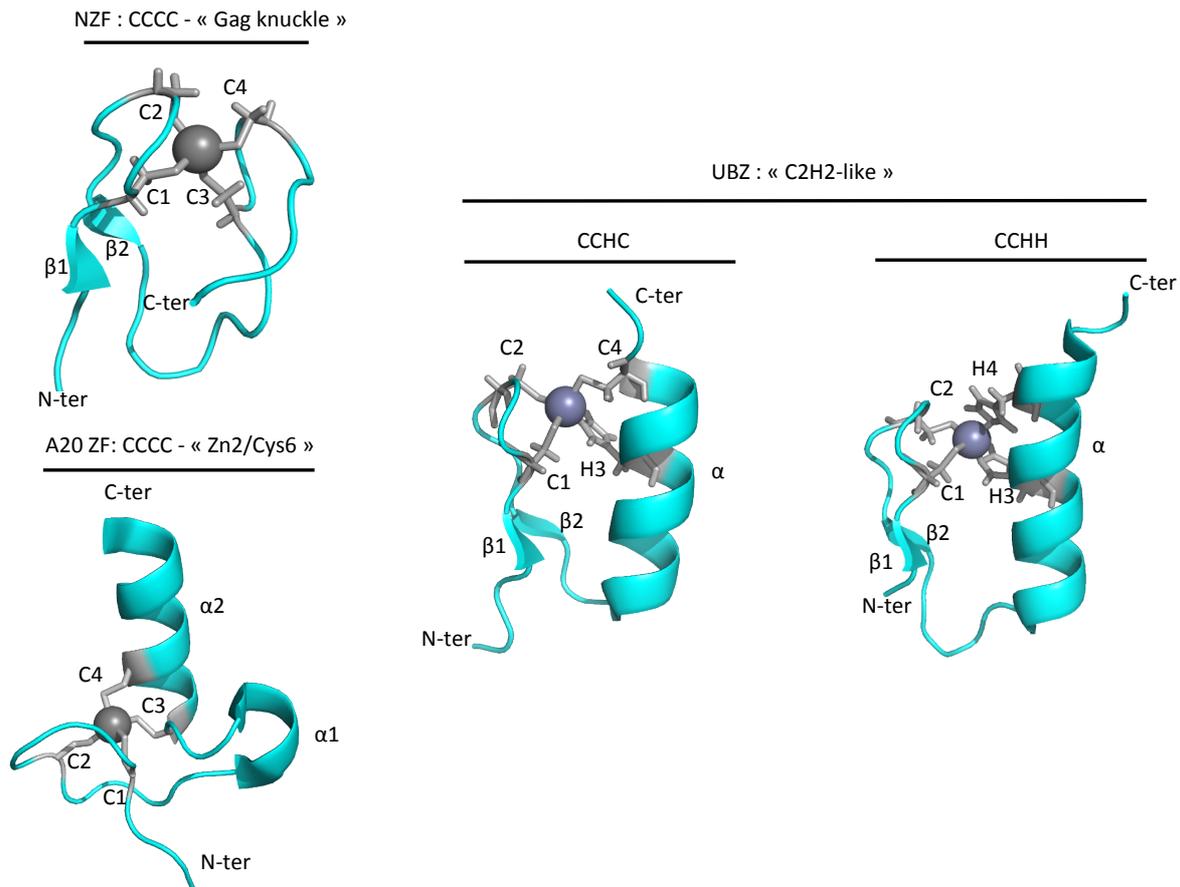


Figure 17 : Classification des familles NZF, A20-ZF et UBZ en fonction de leurs motifs structuraux et de leurs motifs de coordination

Les domaines NZF, A20-ZF et UBZ sont de petits domaines d'environ 30 acides aminés structurés sur la coordination d'un seul atome de zinc. Les NZFs et les A20-ZFs appartiennent à la famille CCCC- « Gag knuckle » et CCCC « Zn2-Cys6 » respectivement. Les UBZ appartiennent à la famille « C2H2-like » et deux motifs de tétra-coordination différents sont retrouvés parmi eux. Le zinc est représenté en sphère grise et les résidus de coordination sont montrés en bâtons gris.

Pour les domaines NZFs des protéines Npl4 et VPS36, aucune sélectivité pour un type de chaînes n'a été observée. Ils ont une affinité de l'ordre de $100 \mu\text{M}$ pour l'ubiquitine et reconnaissent l'ubiquitine au niveau du patch hydrophobe I44 par 2 résidus, Thréonine et Phénylalanine (« empreinte TF ») portés par le coude $\beta1/\beta2$ du ZF (figure 18) [158, 159]. Une méthionine portée par le brin $\beta2$ permet également de stabiliser le complexe par une interaction atypique avec le résidu G47 de l'ubiquitine.

De façon surprenante, tous les autres NZFs, dont la structure est connue, présentent une sélectivité pour un type de chaînes d'ubiquitine. Les NZFs de TAB2 et TAB3 exploitent les propriétés structurales et la flexibilité particulière des chaînes K63. Ceux de HOIL-1 et de Trabid utilisent l'environnement particulier du linker des chaînes M1 et des ubiquitines K29/K33 respectivement.

Le NZF de HOIL-1 se lie sélectivement aux chaînes d'ubiquitine linéaires [160]. Ce domaine interagit avec les mêmes zones de l'ubiquitine que le domaine NOA de NEMO (figure 18). Le patch I44 de l'ubiquitine distale est reconnu par l'empreinte TF du NZF. Comme le domaine NOA de NEMO, ce NZF interagit également avec la queue C-terminale linker (R72) et avec le patch centré autour de la Phe4 de l'ubiquitine proximale permettant d'expliquer la spécificité du domaine pour les chaînes M1. Par ailleurs, il a été observé que ce domaine NZF de la protéine HOIL-1 est suivi par une hélice α . Il a été montré que cette hélice interagissait également avec l'ubiquitine proximale de l'ubiquitine stabilisant encore plus le complexe avec les chaînes M1 (non montré) [160].

Trabid présente trois domaines NZF en tandem en plus de son domaine catalytique et présente une forte sélectivité d'hydrolyse des chaînes d'ubiquitine K29 et K33 [81, 83]. De plus, il a été observé par deux études indépendantes que le NZF1 interagissait sélectivement avec les chaînes d'ubiquitine K29 et K33. Les analyses de la structure cristalline du domaine NZF1 avec la di-ub K29 [81] et la di-ub K33 [83] révèlent que ce domaine interagit avec le patch Ile 44 de l'ubiquitine distale par son empreinte TF (TY ici) et d'un résidu Met porté par la boucle C3/C4 qui interagit également avec le linker entre les 2 ubiquitines (figure 18). De plus, différents contacts permettent une reconnaissance des résidus proches de la lysine K29 portés par l'hélice α de l'ubiquitine proximale. De par la proximité spatiale des résidus K29 et K33 au sein de l'ubiquitine (figure 9) cet environnement est maintenu pour les deux chaînes conférant à cet UBD une sélectivité d'interaction à ces 2 types de chaînes. Par ailleurs, les domaines NZF2 et NZF3 sont également capables de se lier à l'ubiquitine. Le NZF2 isolé, comme le domaine NZF1, se lie de façon sélective aux chaînes K29 et K33. Le NZF3, lui semble se lier de façon sélective aux chaînes K33 suggérant un mode d'interaction différent.

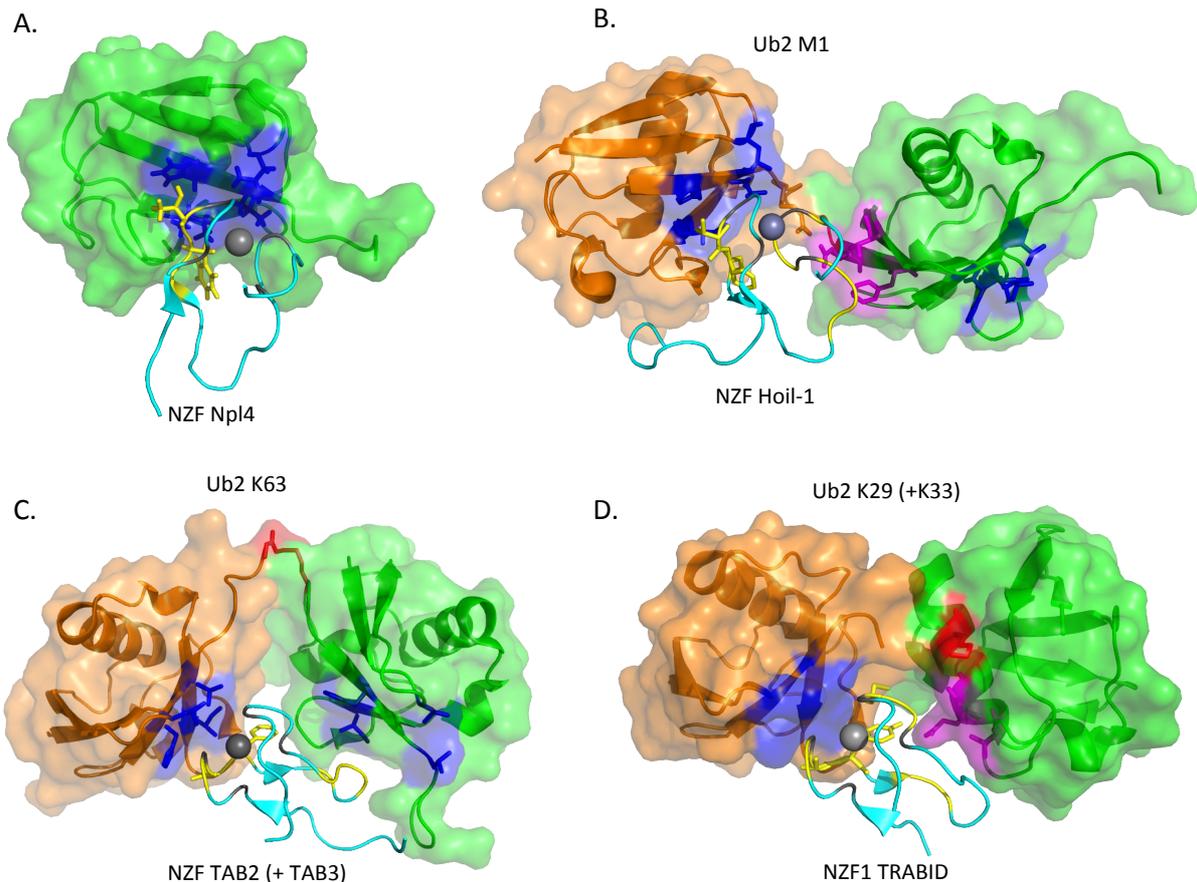


Figure 18 : Mode de reconnaissance de l'ubiquitine par les NZFs

Les complexes de NZF Npl4/mono-Ub (PDB : 1Q5W) (A), de NZF Hoil-1/di-Ub M1 (PDB : 3B08) (B), NZF TAB2/di-ub K63 (PDB : 2WX0) (C) et de NZF1 TRABID/ di-Ub K29 (PDB : 4S1Z) (D) sont montrés. En vert est représentée l'ubiquitine proximale, en orange l'ubiquitine distale. Les patches I44 et phe4 sont représentés en bleu et en magenta respectivement. Le zinc est représenté en sphère et les résidus impliqués dans l'interaction avec l'ubiquitine sont représentés en jaune. Le lien de polymérisation est montré en rouge. En B le lien de polymérisation n'est pas visible sur ce plan et en D, la structure cristallographique est incomplète (linker absent). Les NZFs reconnaissent le patch hydrophobe de l'ubiquitine l'Ile 44 par un motif conservé TY représenté en bâton (TF pour Trabid) porté par le coude $\beta 1/\beta 2$ (« knuckle »). Dans le cas d'interaction sélective avec une chaîne d'ubiquitine, d'autres sites interviennent portés principalement par la boucle flexible entre le brin $\beta 2$ et de la 3^{ème} cystéine (C3) du motif de coordination.

Les NZFs de TAB2 et TAB3 qui ont un mode d'interaction identique se lient sélectivement aux chaînes K63 [135] comparé aux chaînes M1. Les études structurales révèlent que les domaines NZFs de TAB2 et TAB3 se lient au patch hydrophobe I44 de l'ubiquitine proximale et à une partie du patch I44 de l'ubiquitine distale (figure 18) [135, 161]. Les NZFs de TAB2 et TAB3, interagissent avec le patch I44 de l'ubiquitine par l'empreinte TF et l'ubiquitine distale via plusieurs acides aminés hydrophobes portés par la boucle entre le $\beta 2$ et la Cys3. Le linker K63 est positionné du côté opposé à l'interface du

complexe, montrant que la base de la sélectivité de ce domaine pour les K63 ne provient pas de la reconnaissance de celui-ci. Cependant, l'ubiquitine K63 adopte une conformation compacte anguleuse différente de celle observée en solution qui n'est pas permise dans le cas de chaînes linéaires qui présente un linker plus rigide. Ceci explique la sélectivité de ces domaines pour les chaînes K63.

Ainsi, les domaines NZFs présentent un mode de reconnaissance conservé faisant intervenir le motif TF présent entre la 2^{ème} cystéine (C2) du motif de tétra-coordination du zinc et le brin β 2 qui reconnaît le patch I44 de l'ubiquitine distale. La diversité de reconnaissance est apportée par la nature de la boucle flexible β 2/C3 leur permettant d'interagir avec l'ubiquitine proximale (ou non) de différentes façons.

b. Les A20-ZFs

La famille des A20-ZFs porte ce nom car le premier UBD de ce type fut d'abord identifié dans la protéine A20 [162]. Les A20-ZFs présentent un motif de coordination CCCC et présentent une courte hélice α 1 (un tour d'hélice) et une hélice α 2 plus longue (figure 17). Les résidus C1 et C2 sont portés par une boucle, alors que les résidus C3 et C4 sont présents sur la partie N-terminale de l'hélice α 2. Ces domaines appartiennent ainsi à la famille « Zn2/Cys6 » (famille 5). Cette famille est composée des domaines ZFs de A20 (notamment des ZF4 et des ZF7) ainsi que du ZF de la protéine Rabex5.

La protéine A20 porte 7 ZFs en tandem en plus de son domaine catalytique DUB et de son domaine E3. De façon surprenante, les ZF4 et ZF7 de A20 présentent une sélectivité d'interaction pour les chaînes K63 et les chaînes M1 respectivement.

Le domaine ZF4 en interaction avec une tri-ubiquitine K63 interagit avec 3 molécules d'ubiquitines simultanément (Figure 19) [163] qui est le seul domaine connu présentant ce mode d'interaction. Des résidus hydrophobes portés par la longue hélice α 2 interagissent avec le patch Ile44 de l'ubiquitine proximale. L'extrémité N-terminale de l'hélice α 2 reconnaît l'Asp 58 porté par l'hélice 3_{10} de l'ubiquitine intermédiaire et enfin la boucle N-terminale du domaine A20-ZF reconnaît la TEK-Box de l'ubiquitine distale.

De la même façon que le domaine ZF4, le domaine ZF7 interagit avec une di-ubiquitine linéaire un utilisant un grand nombre de contacts différents portés par quasiment

tous ses motifs structuraux (figure 19) [164]. L'hélice longue $\alpha 2$ reconnaît par sa partie C-terminale le patch I44 de l'ubiquitine distale et par son extrémité N-terminale l'Asp 32 de l'ubiquitine proximale par liaison hydrogène. La boucle C1/C2 reconnaît le patch I44 de l'ubiquitine distale. La boucle C2/C3, dont la partie N-terminale de la courte hélice reconnaît l'ubiquitine proximale par un réseau de liaisons hydrogènes, interagit également avec le patch I44 de l'ubiquitine distale par une tyrosine.

La structure du domaine A20-ZF de Rabex5 isolé en interaction avec l'ubiquitine n'a pas été résolue. Ce domaine est associé à un domaine MIU dans la protéine. Il a été observé que le domaine A20-ZF de Rabex 5 interagit avec de la mono-ubiquitine du côté opposé au patch hydrophobe qui, lui, est contacté par le domaine MIU [105]. Ceci montre une nouvelle fois la grande diversité des zones de l'ubiquitine contactées par ces domaines. L'interaction du A20-ZF de Rabex5 avec de la mono-ubiquitine est forte ($15\mu\text{M}$) et ne semble pas être sélective pour un type de chaîne [104, 105].

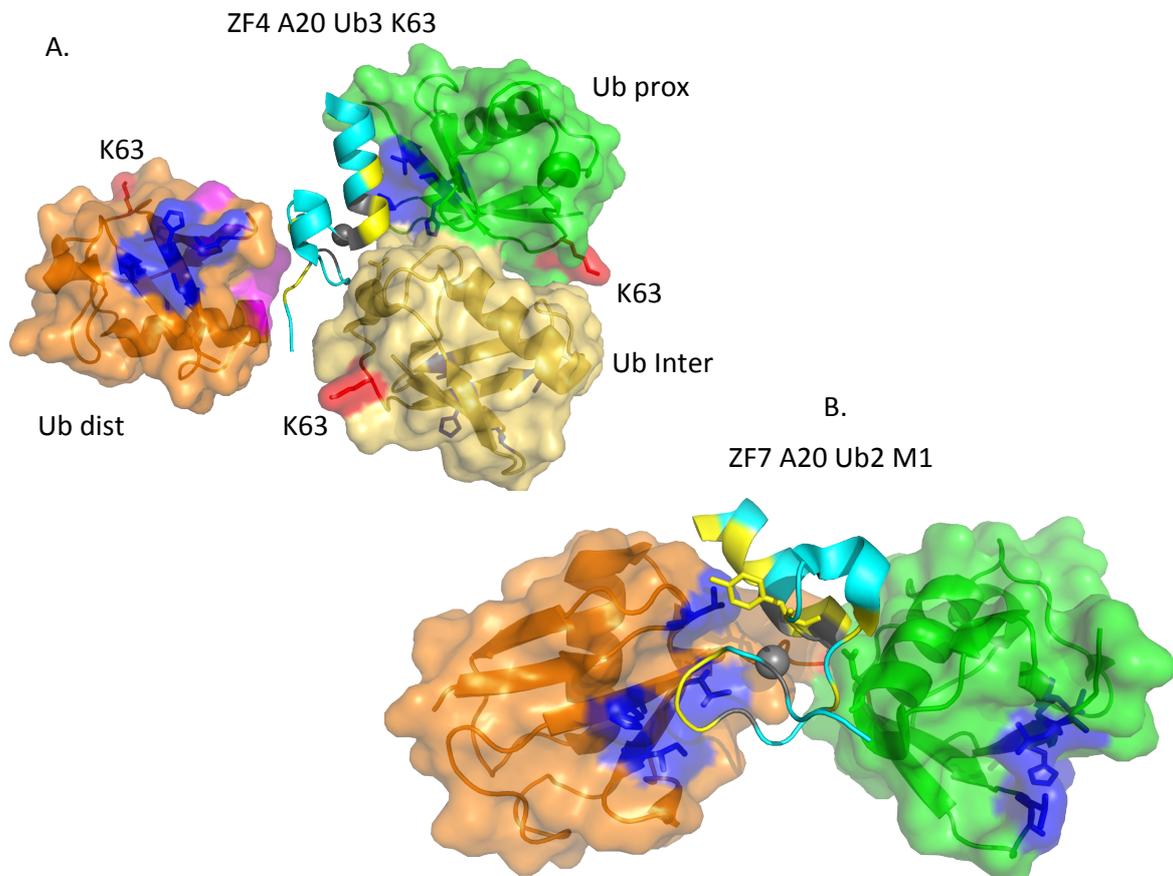


Figure 19 : Les domaines A20-ZFs utilisent un grand nombre de sites différents simultanément pour se lier à l'ubiquitine

Les complexes des ZF4 (PDB : 3OJ3) (A) et ZF7 (PDB : 3VUW) (B) de A20 en interaction avec de la tri-ubiquitine K63 et de la di-ubiquitine M1 respectivement sont montrés. En vert, en or et en orange sont représentés respectivement les ubiquitines proximale, intermédiaire et distale. En rouge est représenté le lien de polymérisation.

En conclusion, les domaines A20-ZF se caractérisent par leur capacité à utiliser de nombreux sites différents pour interagir avec l'ubiquitine. Cette interaction fait notamment intervenir différentes zones « atypiques » de l'ubiquitine. Cela en fait des domaines d'interaction à l'ubiquitine « adaptables » qui peuvent interagir avec l'ubiquitine même si le patch I44 est déjà reconnu par un autre UBD. Cette propriété prend son sens étant donné que ces domaines ne sont retrouvés que dans des protéines qui présentent d'autres UBDs.

c. *Les UBZs*

La famille UBZ, encore mal connue il y a quelques années, est en pleine expansion. De plus en plus d'études menées ces dernières années ont permis de découvrir de nouveaux domaines. Ils représentent ainsi aujourd'hui la plus grande famille au sein des UBDs de type ZF.

Ces domaines régulent différentes fonctions cellulaires dans lesquelles ils jouent un rôle crucial. La majorité des UBZs sont présents dans des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comme la famille des polymérases Y (Pol η , Polt et Pol κ) [107] [165-167], WRNIP1 (*Werner helicase interacting protein 1*) [168, 169] et son homologue chez la levure Mgs1 [170], RAD18 [171-173], FAN1 (*fanconi-associated nuclease 1*) [174], FAAP20 (*fanconi anemia core complex-associated protein 20*) [175-177], SNM1A (*SNM1 homolog A*) [178], SLX4 (UBZ1 et UBZ2) [179, 180] et enfin Spartan [181-183]. De plus, ces domaines sont retrouvés dans des protéines impliquées dans l'autophagie et la xénophagie comme TAX1BP1 (*TAX1 binding protein 1*) (UBZ-1, UBZ-2) [184], NDP52 (*nuclear dot protein 52*) [185, 186] et OPTINEURIN [136, 185]. Enfin, ils jouent également un rôle déterminant dans la régulation de la voie NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) et sont retrouvés dans la protéine NEMO [145, 146] et les protéines ABIN [136].

De façon surprenante, les UBZs sont très souvent impliqués dans la localisation subcellulaire de la protéine qui les porte. Ainsi ces domaines sont nécessaires au recrutement aux sites de lésion de l'ADN des protéines Pol η , Polt [107, 167], WRNIP1 [168, 169], RAD18 [172, 173], FAN1 [174], FAAP20 [175-177], SLX4 [179, 180] et Spartan [181-183]. De plus, ils jouent également un rôle capital dans le recrutement des protéines TAX1BP1 [184] et NDP52 [185, 186] aux sites de l'autophagie.

La majorité des domaines de cette famille reconnaît l'ubiquitine de façon non sélective. L'affinité pour l'ubiquitine de ces domaines isolés varie environ entre 20 et 300 μ M.

D'un point de vue structural, la famille des UBZ est caractérisée par une topologie $\beta\beta\alpha$ basée sur une coordination autour d'un seul atome de zinc. Les deux premiers résidus de coordination sont portés par le coude (« knuckle ») entre les brins β et les deux derniers par la partie C-terminale de l'hélice α . Les UBZs sont ainsi de la famille « C2H2-like » qui est

connue pour contenir majoritairement des ZFs d'interaction à l'ADN. Néanmoins il existe deux motifs de tétra-coordination différents au sein des UBZs : CCHH et CCHC. Par exemple les deux UBZs de TAX1BP1, l'UBZ de NDP52 et l'UBZ de Pol η sont des CCHH-« C2H2-like » alors que les UBZs de WRNIP1, RAD18 ou NEMO sont des CCHC-« C2H2-like ».

Une première classification des domaines UBZs basée sur leur motif de coordination et leurs fonctions a déjà été proposée par le passé. Des études récentes de la structure de certains UBZs ont révélé différents modes d'interaction pour l'ubiquitine. Ces données montrent néanmoins que les UBZs reconnaissent tous l'ubiquitine par le patch I44 hydrophobe de l'ubiquitine. De plus, cette interaction est stabilisée par des contacts polaires et/ou électrostatiques faisant souvent intervenir un résidu acide fortement conservé au sein de la famille des UBZs porté par l'hélice α .

En revanche, le mode d'interaction du patch hydrophobe varie en fonction des UBZs. Certains interagissent avec le patch hydrophobe I44 de l'ubiquitine de façon centrée sur l'hélice α (DNA-like) et d'autres où le patch I44 de l'ubiquitine est centré entre les brins β et l'hélice α (WRNIP1-like). Enfin, l'UBZ de la protéine NEMO qui ne présente pas ce résidu acide, semble présenter un mode d'interaction encore différent. Pour la majorité des UBZs, aucune donnée structurale n'existe à ce jour.

Les UBZs qui interagissent avec l'ubiquitine de façon centrée sur leur hélice α sont constitués des domaines UBZ de NDP52 (X-Ray) [186], de Pol η (modèle basé sur des données RMN et de mutagenèse) [187] et de celui de FAAP20 (RMN) [176, 177]. Ces domaines présentent un motif conservé D_{xxx}A/C_{xx}L porté par l'hélice α (figure 20). Notons que dans les domaines de reconnaissance à l'ADN qui utilisent également majoritairement leur l'hélice pour interagir, la nature des résidus à ces positions est souvent différente et est souvent constituée de résidus basiques. Les résidus alanine (pour NDP52 et Pol η) ou cystéine (pour NDP52) ainsi que le résidu leucine reconnaissent le patch hydrophobe I44 de l'ubiquitine. Le résidu acide, lui, est impliqué dans des liaisons hydrogènes avec les résidus portés par la boucle B4/B5 flexible de l'ubiquitine.

Une phénylalanine pour NDP52 et Pol η et une leucine pour FAAP20 en position +3 par rapport à l'aspartate conservée permettent de renforcer l'interaction avec le patch I44. De plus une glutamine (Aspartate chez Pol η) présente dans NDP52 et FAAP20 portée par la partie N-terminale de l'hélice reconnaît également la boucle β 4/ β 5 par liaison hydrogène.

Cependant, FAAP20 présente la particularité de posséder une boucle C-terminale qui renforce l'interaction avec l'ubiquitine. Elle porte une sérine et un aspartate qui reconnaissent les Arg42 et Arg72 de l'ubiquitine par liaison hydrogène et liaison électrostatique respectivement. Un tryptophane C-terminal contribue également à l'interaction avec l'ubiquitine par liaison hydrogène. Les affinités des UBZs de FAAP20, NDP52 et Pol η pour l'ubiquitine sont d'environ 20, 30 et 50 μ M respectivement.

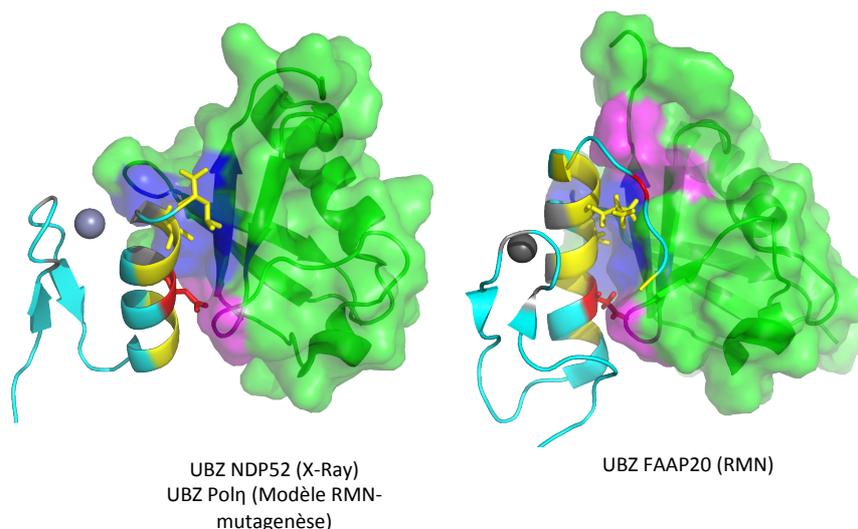


Figure 20 : Mode d'interaction des UBZ qui reconnaissent l'ubiquitine de façon centrée sur l'hélice α

Est représenté à gauche l'UBZ NDP52 (PDB : 4XKL). La structure de l'UBZ pol η a été résolue sous sa forme apo (PDB : 3WUP) et des données de RMN et de mutagenèse ainsi que la conservation du motif D_{xxx}A/C_{xx}L suggèrent un mode de reconnaissance similaire à celui de NDP52. FAAP20 (PDB : 2MUR) a la particularité de posséder une boucle C-terminale qui renforce l'interaction avec l'ubiquitine. En rouge sont représentés les résidus acides, en jaune les autres résidus impliqués dans l'interaction et en bâton les résidus conservés D_{xxx}A/C_{xx}L au sein des 3 protéines. En bleu est représenté le patch hydrophobe I44 de l'ubiquitine et en violet les autres sites contactés au sein de l'ubiquitine.

Les UBZs WRNIP1 et RAD18 reconnaissent l'ubiquitine avec un mode de reconnaissance totalement différent des UBZs présentés précédemment [169, 188]. Le patch hydrophobe de l'ubiquitine est reconnu par l'ensemble du brin β 1, du coude β 1/ β 2 (« knuckle ») et de l'hélice α par 6 acides aminés hydrophobes parfaitement conservé au sein de WRNIP1 et RAD18 (figure 21). Néanmoins un point commun avec la famille des UBZs « DNA-like » est l'utilisation du résidu acide porté par l'hélice α . Ici en revanche le résidu aspartate fait un pont salin avec le résidu Arg42 de l'ubiquitine et n'interagit pas avec la

boucle $\beta 4/\beta 5$ par liaison hydrogène. Enfin la présence d'une glutamine portée par l'hélice interagit avec la leucine 71 de l'ubiquitine par liaison hydrogène.

La seule différence qui existe entre WRNIP1 et RAD18 est un contact par liaison hydrogène entre l'alanine portée par la boucle C-terminale flexible de WRNIP1 et la lysine K48 de l'ubiquitine. Les UBZ de RAD18 et WRNIP1 interagissent avec l'ubiquitine de façon non sélective avec une affinité entre 20 et 50 μM .

Par ailleurs, le domaine UBZ au sein de RAD18 est suivi par une hélice α [173] qui peut interagir avec l'ubiquitine proximale au sein de di-ubiquitines [173]. Les auteurs ont observé une spécificité de l'UBZ^{RAD18}/hélice pour les chaînes K63 et M1 comparées aux K48 mais ces résultats, en terme de sélectivité, sont à interpréter avec précaution car une protéine de RAD18 fusionnée à la GST, qui est susceptible de produire des artefacts de sélectivité a été utilisée [189].

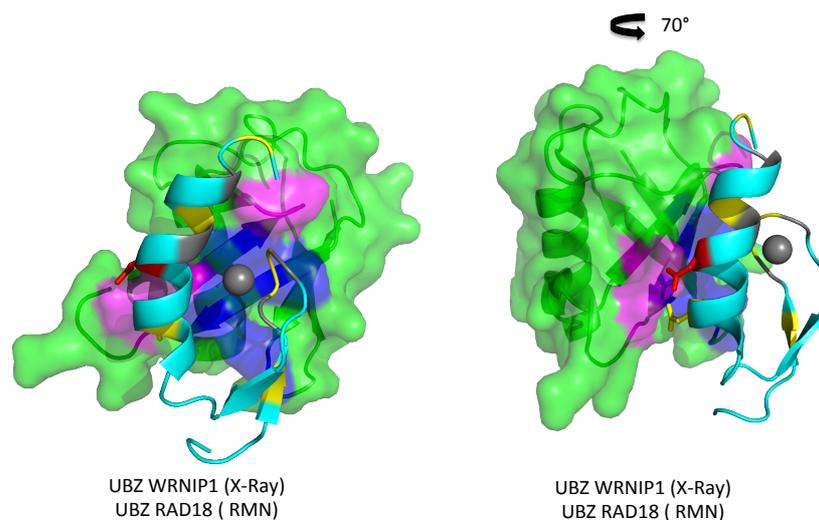


Figure 21 : Mode d'interaction à l'ubiquitine des UBZ « WRNIP1-like »

(PDB : 2MRE) Contrairement aux UBZ « DNA-like » les UBZ « WRNIP1-like » présentent un mode d'interaction du patch I44 de l'ubiquitine centré sur l'ensemble de leurs motifs structuraux. Ces domaines présentent également un résidu acide porté par l'hélice mais qui interagit avec l'ubiquitine en faisant un pont salin avec l'Arg42 de l'ubiquitine. En bleu est représenté le patch hydrophobe de l'ubiquitine, en jaune les sites d'interaction présents sur l'UBZ et en rouge le résidu acide critique dans l'interaction avec l'ubiquitine.

Ainsi, ces deux classes d'UBZ (« DNA-like » et « WRNIP1-like ») reconnaissent l'ubiquitine par un résidu acide qui est crucial dans l'interaction avec l'ubiquitine. Une mutation de ce résidu conduit à une perte d'interaction drastique à l'ubiquitine déterminée

expérimentalement notamment pour les UBZs de WRNIP1 [168, 169], RAD18 [173], FAAP20 [175-177], NDP52 [186], l'UBZ2 de TAX1BP1 [184], l'UBZ1 de TAXBP1 [184], POL η et POL ι [107, 187].

Cependant certains UBZs ne présentent pas de résidus acides portés par l'hélice stabilisant l'interaction avec l'ubiquitine, suggérant un mode d'interaction encore différent. C'est le cas par exemple de l'UBZ de la protéine NEMO. Pour le domaine NEMO pour lequel il existe un modèle structural basé sur des données RMN et de mutagénèse, un mode d'interaction encore différent des 2 premières familles est en effet observé (Figure 22) [145]. Le domaine UBZ de NEMO présente un mode d'interaction centré autour des brins β et de l'hélice, mais on observe un retournement de 90° « à gauche » du domaine NEMO comparé aux UBZ « WRNIP1-like ». De plus, l'hélice de NEMO présente de nombreux résidus hydrophobes dans sa partie C-terminale, notamment parce que le résidu acide est remplacé par une méthionine chez NEMO. L'analyse de l'interface montre qu'à la différence des UBZs « WRNIP1-like » c'est presque uniquement la partie C-terminale de l'hélice qui reconnaît le patch hydrophobe de l'ubiquitine par 5 résidus différents. Les résidus Pro et Cys portés par le brin β 1 et par la boucle β 1/ β 2 respectivement contribuent probablement aussi à l'interaction en reconnaissant la boucle β 4/ β 5 de l'ubiquitine.

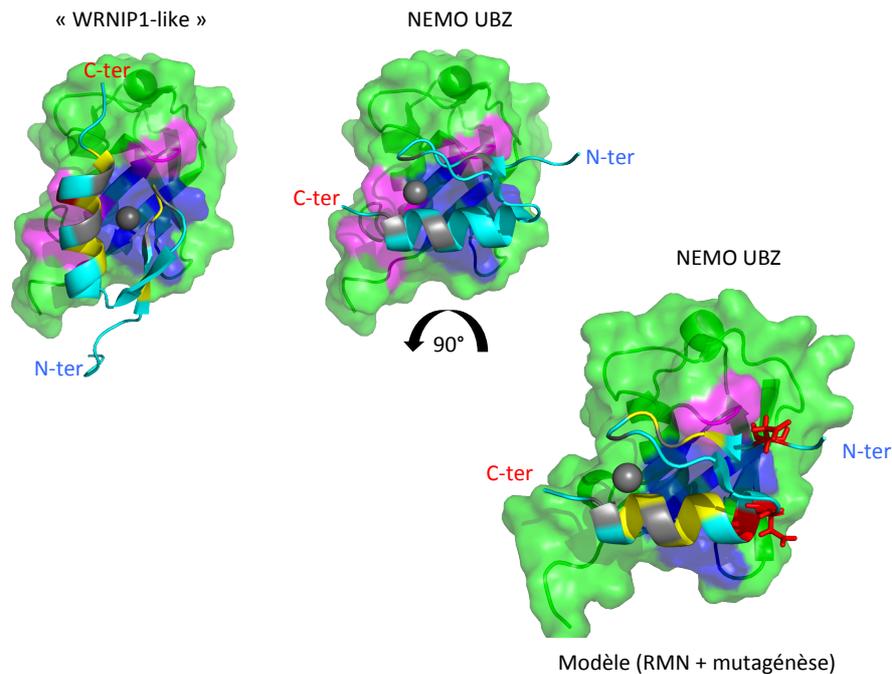


Figure 22 : Mode d'interaction du l'UBZ de NEMO

L'UBZ de NEMO reconnaît le patch hydrophobe I44 de l'ubiquitine de façon centrée sur ses brins β et son hélice α comme la famille « WRNIP1-like ». Cependant un retournement de 90° de l'UBZ de NEMO à « gauche » comparé à celui des « UBZ WRNIP1 » est observé. L'interaction est surtout médiée par les résidus hydrophobes portés par la partie C-terminale de l'hélice α sûrement parce que ce domaine ne présente pas le résidu acide conservé au sein des UBZ. Deux résidus acides montrés en bâton rouges sont importants pour l'interaction de NEMO aux di-ubiquitines en reconnaissant une deuxième molécule d'ubiquitine.

L'UBZ de NEMO se lie avec une affinité faible pour la mono-ubiquitine (environ $300 \mu\text{M}$) [145, 146]. Cependant, de façon intéressante, il a été montré que ce domaine présente un deuxième site d'interaction à l'ubiquitine dépendant notamment de deux résidus acides portés par les parties N-terminales de l'UBZ et l'hélice α (Figure 22). Ce domaine reconnaît ainsi les di-ubiquitines avec une affinité d'environ $40 \mu\text{M}$ de façon non sélective [146].

Ainsi les domaines UBZs se caractérisent par une grande diversité dans leur mode de reconnaissance à l'ubiquitine. Au moins 3 modes d'interactions différents existent au sein de cette famille « DNA like », « WRNIP1-like » et NEMO. Par ailleurs, la grande majorité des UBZs utilisent un résidu acide fortement conservé porté par l'hélice α .

d. Les ZF-UBPs

Enfin, la famille ZF-UBP est plus complexe par sa structure que par son mode d'interaction à l'ubiquitine qui est conservé au sein de tous ses membres. Ces domaines sont présents dans un grand nombre de déubiquitinases USP (en plus de leur domaine catalytique), une famille de déubiquitinases qui ne présentent pas dans sa grande majorité de propriétés sélectives à un type de chaîne. Les DUBs USP jouent un rôle crucial dans l'homéostasie du pool d'ubiquitine cellulaire (cf. section). Les domaines ZF-UBPs sont notamment présents dans les enzymes USP5 (ou IsoT) [75], USP33 (VDU1), USP7 (Hausp), USP16 (UBP-M), la DUB de levure UBP8 [190], l'histone déacétylase HDAC6 [191] et dans l'E3 ligase de levure scIMP (homologue de IMP chez l'homme).

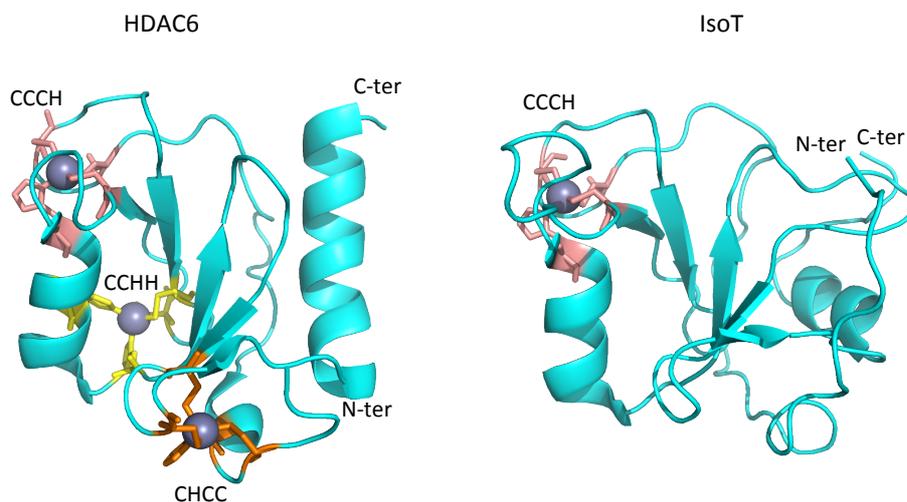


Figure 23 : Structure des ZF-UBPs

Les ZF-UBPs présentent au moins deux hélices α et un feuillet β antiparallèle. Cette structure est stabilisée dans la majorité des ZF-UBPs comme HDAC6 (PDB : 3PHD) par 3 motifs de coordination distincts. Le motif 1 est représenté en orange, le motif 2 en saumon et le motif 3 en jaune. Pour le ZF-UBP d'isoT (PDB : 2G43) uniquement le motif de coordination 2 est présent. Celui-ci est suffisant dans IsoT pour maintenir la position relative de l'hélice- α N-terminale et du feuillet β qui est importante dans le mode de reconnaissance à l'ubiquitine.

Les ZF-UBPs sont structurés autour de 3 molécules de zinc qui sont coordonnées par 3 motifs de tétra-coordination distincts. Le motif 1 est de type CHCC, le motif 2 de type CCCH et le motif 3 de type CCHH [75, 190, 191] (figure 23). Ces domaines présentent un feuillet β constitué de 5 brins β antiparallèles encadré d'au moins 2 hélices α . Dans le cas de la protéine IsoT, seul le motif de tétra-coordination 2 est conservé et son domaine ZF-UBP ne se lie qu'à

une molécule de zinc [75]. Cependant les deux types de domaines ZF UBPs interagissent par le même mode d'interaction à l'ubiquitine. Celui-ci, unique au sein de la famille des UBDs, ne fait quasiment intervenir que la queue C-terminale ⁷²RLRGG⁷⁶ de l'ubiquitine et particulièrement les G75 et 76 (figure 24). Les G75 et 76 s'enfouissent dans une cavité profonde au sein du domaine formée entre l'hélice α N-terminale et le feuillet β et sont reconnus par un grand nombre de liaison hydrogènes. Ce mode d'interaction confère à ces domaines la plus forte affinité pour de la mono-ubiquitine (environ 0,5 -1 μ M) parmi l'ensemble des domaines UBDs.

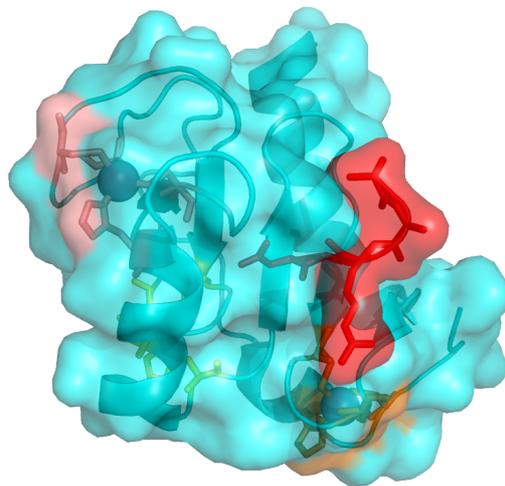


Figure 24 : Mode de reconnaissance de l'ubiquitine par les ZF-UBPs

N'est représentée ici que la queue C-terminale de l'ubiquitine en interaction avec la protéine HDAC6 (PDB : 3PHD). Des modes identiques ont été observés pour les domaines UBP IsoT et UBP8. En rouge est représentée la partie C-terminale de l'ubiquitine et en cyan le domaine UBP. Les résidus G75 et G76 de l'ubiquitine s'enfouissent dans une cavité profonde formée par l'hélice α N-terminale et le feuillet β des UBP.

Ces domaines ont été uniquement détectés dans des enzymes et il a été montré qu'ils pouvaient jouer un rôle important dans l'activité de celles-ci notamment par régulation allostérique. Il a été suggéré que ces domaines par leur mode de reconnaissance particulier pourraient jouer un rôle de senseur de la concentration d'ubiquitine cellulaire libre. Ils pourraient alors réguler l'activité des déubiquitinases USP en fonction de celles-ci afin de maintenir l'homéostasie du pool d'ubiquitine cellulaire libre.

III) Diversité fonctionnelle de l'ubiquitine

Avant d'aborder les fonctions principales associées à l'ubiquitine et aux chaînes d'ubiquitine, il est intéressant d'avoir une idée des proportions de ces dernières dans la cellule.

A. La démographie cellulaire de l'ubiquitine et des chaînes de poly-ubiquitine

Dans les cellules humaines, quatre gènes codent pour l'ubiquitine. Deux d'entre eux, l'*UbB* et *UbC* (*ubiquitin B-C*) codent pour des chaînes d'ubiquitine linéaires de 3 et de 9 molécules d'ubiquitine respectivement. Les gènes *UBA52* (*ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1*) et *RPS27A* (*ribosomal protein S27a*) codent pour des sous-unités ribosomales qui sont fusionnées en C-terminale à de la mono-ubiquitine [192]. Ces molécules d'ubiquitine sont hydrolysées rapidement par des déubiquitinases (non-identifiées) afin de libérer des monomères d'ubiquitine qui sont utilisées pour l'ubiquitination des protéines cellulaires.

Le pool d'ubiquitine cellulaire, constitué de mono-ubiquitine et des chaînes de poly-ubiquitine libres ou liées covalamment aux différentes protéines cellulaires, a pu être estimé à environ 85 μM dans des cellules HEK293 (*human embryonic kidney cells 293*) [193]. La mono-ubiquitination est le type d'ubiquitination le plus abondant dans la cellule - environ 65 % du pool total - et elle est massivement impliquée dans l'ubiquitination des histones [193, 194] (figure 25). Approximativement 15 % du pool cellulaire d'ubiquitine représentent des chaînes d'ubiquitine attachées aux protéines modifiées et l'ubiquitine libre (constitué de mono et de poly-ubiquitines) représente environ 20 % de l'ubiquitine cellulaire totale (figure 25). Parmi les chaînes d'ubiquitine, les chaînes K48 et les chaînes K63 sont largement majoritaires. Les chaînes K11 arrivent en troisième position suivies des chaînes K29 et K6. Enfin l'ensemble des chaînes M1, K33 et K27 représente environ 1% des chaînes d'ubiquitines totales.

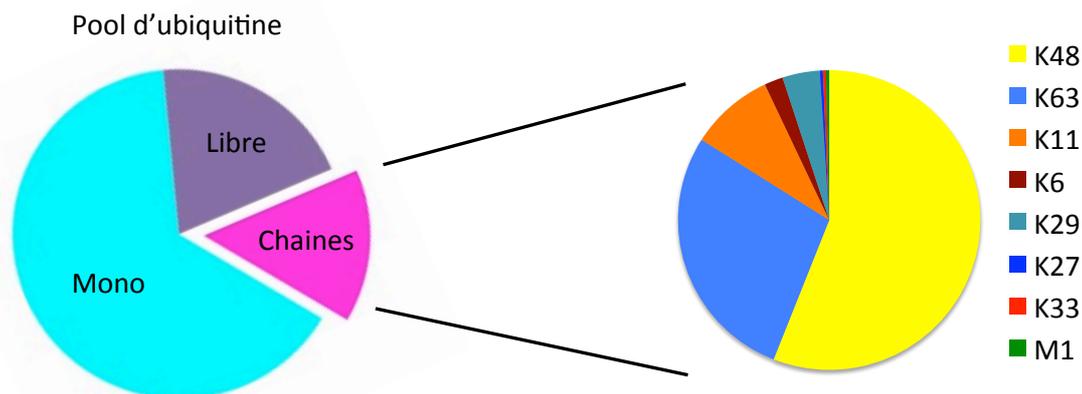


Figure 25 : Schéma représentant les proportions approximatives des différents types d'ubiquitine cellulaire

A gauche est représentée la proportion d'ubiquitine cellulaire déterminée par spectrométrie de masse dans des cellules HEK293 [193]. A droite est représentée la proportion des différents types de chaînes d'ubiquitine dans des cellules U20S [110].

Cependant, la concentration d'ubiquitine totale ainsi que la proportion des différents types d'ubiquitine varient en fonction de la lignée cellulaire et de l'étape du cycle cellulaire. Ces résultats doivent donc être interprétés avec la plus grande précaution. Par exemple, une augmentation significative des chaînes K11 a été observée en mitose [195]. De plus, ils ne prennent pas en compte le paramètre essentiel qu'est la compartimentation cellulaire, certains types d'ubiquitine pouvant atteindre des concentrations locales drastiquement différentes [196]. Néanmoins, ces résultats issus d'analyse de spectrométrie de masse donnent une idée globale de la démographie de l'ubiquitine cellulaire.

B. Le code de l'ubiquitine

Les protéines modifiées par les différents types de chaînes d'ubiquitine qui font intervenir les enzymes de synthèse de l'ubiquitine et les déubiquitinases sont reconnues par les protéines effectrices qui contiennent des UBDs conduisant à un destin différent de la protéine ubiquitylée. Ainsi, comme des mots (pour l'ubiquitine) ou des phrases (pour les chaînes), les différents types d'ubiquitine codent une information qui est décodée par les UBDs déterminant le sort de la protéine modifiée. Historiquement, l'idée d'un code de l'ubiquitine a émergé de l'observation des conséquences distinctes des chaînes dégradatives K48 et des chaînes non dégradatives K63.

Depuis, la compréhension des mécanismes impliqués dans la signalisation liée à l'ubiquitine a permis de montrer que le dogme qui consiste à associer un type d'ubiquitine à une fonction cellulaire a largement été démenti. Différents types d'ubiquitines ont notamment été identifiés comme pouvant avoir la même fonction alors qu'un même type de chaîne peut présenter une pléiotropie fonctionnelle. Ainsi, la fonction des types d'ubiquitine dépend également d'autres facteurs faisant notamment intervenir la nature de la protéine modifiée, sa compartimentation cellulaire et son environnement moléculaire [196, 197]. Néanmoins, ont pu être identifiées des fonctions majeures à ces différents types d'ubiquitine qui définissent le code de l'ubiquitine (figure 26).

La mono-ubiquitination et la multi mono-ubiquitination - dans laquelle différentes lysines sur la même protéine sont modifiées par mono-ubiquitination - conduisent à la modification des interactions intra ou intermoléculaires de la protéine substrat modifiant sa localisation cellulaire, la nature de ses interactants ou son activité [198]. Elles ont longtemps été considérées comme étant majoritairement non dégradatives mais il a été mis en évidence que 40% des protéines mono ou multi-mono ubiquitinées sont dégradées par le protéasome [199-201]. Ce type de modification a été associé à un grand nombre de fonctions cellulaires. Citons tout de même, une de ses fonctions majeures dans la régulation de l'expression des gènes en modifiant les histones [12, 202]. Des fonctions bien caractérisées dans l'endocytose, la réparation de l'ADN et dans de nombreuses autres fonctions cellulaires ont également été mises en évidence [203-205].

Les chaînes K48 sont très majoritairement impliquées dans la dégradation de la protéine cible par le protéasome qui contient un grand nombre d'UBDs sélectifs de ces chaînes. L'inhibition du protéasome conduit à une augmentation drastique des chaînes K48 [206, 207]. De plus, différentes E3-ligases qui sont connues pour leur implication dans la dégradation protéasomale produisent ce type de chaînes comme par exemple l'E3 associée au cycle cellulaire SCF et l'E3 associée à la dégradation du réticulum endoplasmique E3gp78 [208, 209]. Néanmoins même pour les chaînes K48, de rares exemples montrent que cette modification peut ne pas conduire à la protéolyse de la protéine cible. Cela fait souvent intervenir un rôle protecteur par des UBDs qui se lient à ce type d'ubiquitine empêchant sa reconnaissance par le protéasome [210].

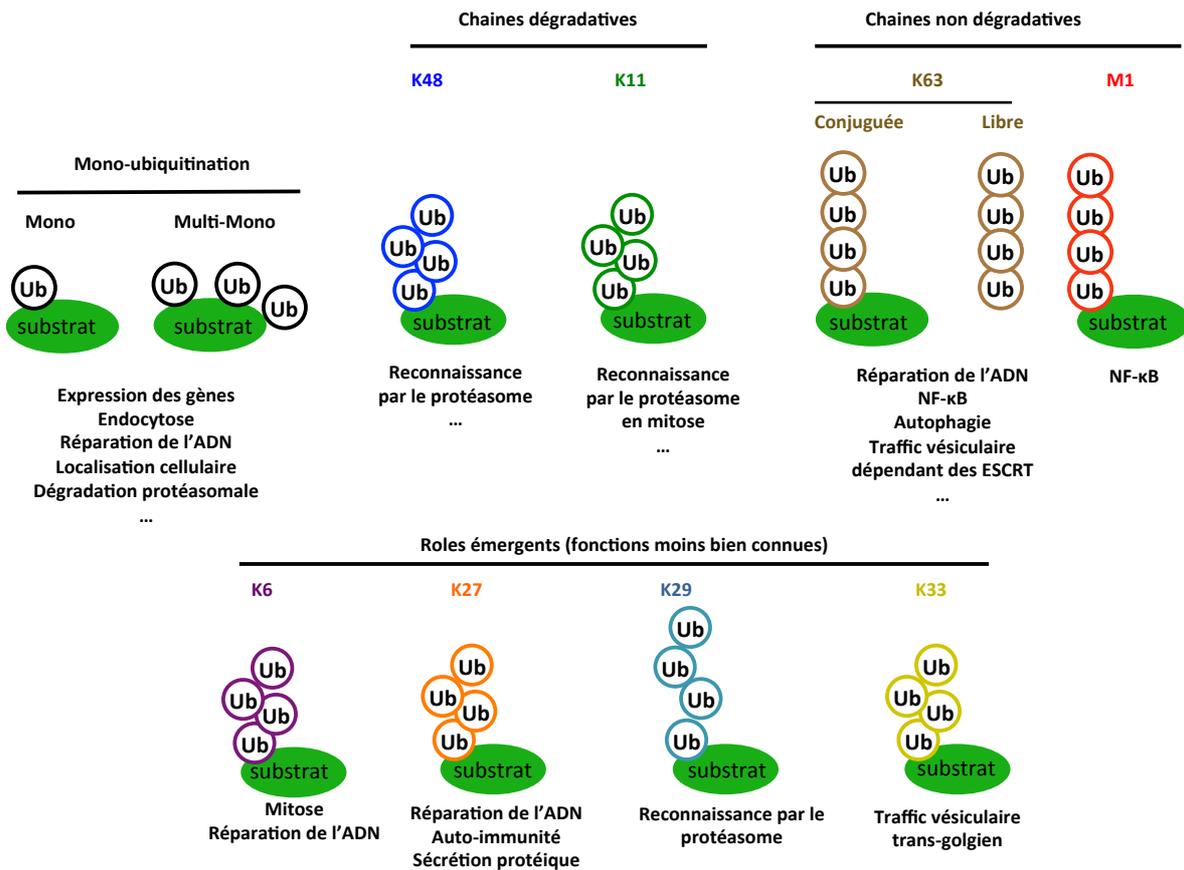


Figure 26 : Fonctions principales des différents types d'ubiquitine : le code de l'ubiquitine

La mono ubiquitination et la multi mono-ubiquitination des protéines régulent l'activité des protéines sans conduire en général à sa dégradation protéasomale. Les chaînes K11 et K48 sont majoritairement impliquées dans la dégradation des protéines cibles par le protéasome. Les chaînes K63 à l'inverse ne conduisent pas à la dégradation de la protéine cible par le protéasome et régulent l'activité de la protéine modifiée de différentes manières. Des fonctions moins bien caractérisées des chaînes K6, K27 et K29 et K33 commencent à être mises en évidence.

Comme les chaînes K48, les chaînes K11 conduisent principalement à la dégradation protéasomale des protéines modifiées [211]. Chez l'homme, ce type de modification augmente pendant la mitose et ces chaînes sont produites spécifiquement par l'E3 APC/C en association avec l'E2 Ube2S qui sont connues pour leur rôle dégradatif durant la mitose [77, 99]. On peut donc associer les chaînes K11 à des chaînes dégradatives mais qui ont un rôle important durant la mitose et particulièrement pendant l'anaphase [99]. Un rôle potentiel de ces chaînes dans la dégradation de la protéine substrat de façon indépendante du protéasome a également été observé. Il serait probablement lié à l'autophagie [212, 213].

Contrairement aux K48 et K11, les chaînes K63 qui présentent des propriétés structurales totalement différentes, régulent les protéines en modulant leur activité, leur

conformation, leurs partenaires protéiques ou encore leur localisation cellulaire [198, 214, 215]. Ces chaînes sont notamment impliquées dans l'activation de la voie NF- κ B [136, 216, 217], la réparation de l'ADN [203, 218, 219], la réponse immunitaire innée [220], l'assemblage de complexes impliqués dans l'épissage des ARN [221] et la traduction [222]. Bien que ces chaînes ne soient quasiment pas impliquées dans la dégradation protéasomale [160], les chaînes d'ubiquitine K63 ont également une fonction critique dans la voie de dégradation lysosomale [205]. Ainsi, un rôle de l'ubiquitine K63 a pu être identifié dans la dégradation lysosomale non-vésiculaire appelé autophagie [223]. De plus ces ubiquitines « décorent » les protéines membranaires des vésicules qui sont reconnues par le complexe ESCRT permettant la formation de corps multi-vésiculaires, qui sont essentiels dans la voie de dégradation lysosomale vésiculaire [123, 224]. Fait intéressant, il a été observé de façon occasionnelle que ces chaînes peuvent être présentes également sous la forme de chaînes libres dans la cellule afin de jouer leur fonction [225, 226].

Les chaînes M1, comme les chaînes K63 ont été décrites comme étant non dégradatives. Elles sont impliquées en tant que régulateurs positifs de l'activation de la voie de signalisation NF- κ B [141] dans laquelle notamment l'UBD NOA de NEMO [76, 80], la DUB OTULIN et l'E3-ligase LUBAC qui sont sélectifs des chaînes M1 y jouent un rôle. Des fonctions dans la régulation de la production d'interféron et le contrôle de la voie WNT durant la formation des vaisseaux sanguins ont été suggérées. Enfin, deux études récentes montrent l'importance de l'ubiquitine linéaire dans l'immunité anti-bactérienne [227, 228]. Suite à l'infection par la bactérie *Salmonella typhimurium*, des chaînes linéaires sont synthétisées par LUBAC « décorant » les bactéries cytosoliques d'ubiquitine linéaire. Le récepteur de l'autophagie OPTINEURIN ainsi que la protéine activatrice de la voie NF- κ B NEMO sont alors recrutés au niveau de la bactérie permettant respectivement l'élimination des bactéries par xénophagie et l'induction de l'expression de gènes importants dans l'immunité antibactérienne via l'activation de la voie NF- κ B.

Enfin, la compréhension fonctionnelle des chaînes K6, K27, K29 et K33 commence à peine à émerger et est encore mal connue.

Les chaînes K6 ont été observées comme jouant un rôle important dans la dégradation des mitochondries par autophagie (mitophagie) de façon dépendante de l'E3 ligase Parkin [229, 230] et une étude montre un rôle des chaînes K6 dans la mitose en modifiant les

microtubules [231]. De plus, une autre étude a révélé que ces chaînes sont enrichies dans les cellules en réponse à un stress génotoxique [232].

Des études récentes mettent en évidence que les chaînes K27 sont retrouvées au niveau des histones H2A, H2B de façon dépendante de l'E3 ligase RNF168 (*RING finger protein 168*) et qu'elles pourraient jouer un rôle important dans la réparation de l'ADN double brin [233]. De façon intéressante, les UBDs impliqués dans la réponse à ce type de lésions d'ADN présentent une affinité élevée pour ces chaînes *in vitro* [233]. Par ailleurs, deux études montrent que l'E3 ligase HACE1 serait capable d'assembler ce type de chaîne sur les protéines *Y-box protein 1* (YB-1) et OPTINEURIN [234, 235]. Des rôles de ces chaînes dans la sécrétion protéique ont été proposés en utilisant YB-1 comme modèle et dans l'autophagie via OPTINEURIN.

Les chaînes K29 et K33 ont été associées à la dégradation de la protéine cible par le protéasome [236, 237]. Une étude montre que les chaînes K33 jouent un rôle important dans le trafic vésiculaire trans-golgien [238]. Ces chaînes sont synthétisées par l'E3 ligase *Cullin-3* complexée à la protéine KLHL20 (*Kelch-like protein 20*) dans cette fonction. De plus, un rôle de ces chaînes a été décrit dans l'immunité anti-bactérienne [239]. En outre, la mise en évidence de TRABID qui déubiquitine sélectivement les chaînes K29 et K33 a donné de nouvelles pistes sur les fonctions portées par ces chaînes. TRABID est impliquée dans la régulation épigénétique et dans la voie de signalisation WNT [240, 241]. L'implication directe des chaînes K29 et/ou K33 n'a cependant pas été encore mise en évidence.

Contrairement aux chaînes M1, K11, K48 et K63 il n'a pas encore été décrit d'enzymes synthétisant spécifiquement les chaînes de type K6, K27, K29 et K33. Les seules enzymes permettant la synthèse de ces chaînes présentent une activité mixte comme par exemple l'E3 ligase PARKIN qui génère des chaînes K6 mais également des chaînes K11, K48 et K63 [242-244].

L'impact fonctionnel de la longueur de la chaîne d'ubiquitine, ainsi que la présence de plusieurs chaînes d'ubiquitines sur le même substrat sont peu connus car elles sont difficilement appréhendables. Néanmoins, au vu des propriétés des UBDs qui interagissent très souvent de façon coopérative, il est clair que ces paramètres jouent un rôle majeur. Dans le cas de la dégradation par le protéasome par exemple, la longueur minimale pour une reconnaissance efficace est de 4 molécules d'ubiquitines K48 [245]. Une étude récente montre que deux chaînes de di-ubiquitine K48 présentes sur deux lysines proches

spatialement est également efficace [246]. Cet exemple illustre une nouvelle fois la complexité du code de l'ubiquitine.

Par ailleurs, de nombreuses études effectuées ces toutes dernières années ont révélé que la complexité du code de l'ubiquitine est encore bien plus grande.

C. La complexité croissante du code de l'ubiquitine

1. Les chaînes hétérotypiques

Le premier élément qui augmente considérablement la complexité du code de l'ubiquitine est l'existence de chaînes d'ubiquitine hétérotypiques appelées également hybrides. Contrairement aux chaînes décrites précédemment, appelées homotypiques, ce type de chaînes est constitué de molécules d'ubiquitines qui ne sont pas connectées entre elles par la même lysine. Parmi elles, on peut encore considérer deux familles : les chaînes mixtes et les chaînes branchées (figure 27). Contrairement aux chaînes mixtes, au sein d'une chaîne branchée au moins une molécule d'ubiquitine est simultanément « branchée » par au moins deux lysines différentes à deux molécules d'ubiquitines. Aucune donnée structurale des chaînes hétérotypiques n'a été générée pour le moment.

Bien que la découverte des chaînes hétérotypiques soit récente, plusieurs études ont révélé qu'elles étaient présentes de façon non négligeable dans la cellule et ont suggéré qu'elles pourraient même être beaucoup plus représentées qu'on ne le pense pour le moment. La présence de ces chaînes pourrait expliquer par exemple pourquoi différents types d'ubiquitine sont impliqués dans la même fonction. Il a été montré que 20 % des chaînes K63 étaient présentes au sein de chaînes branchées avec des liens de polymérisation de type K48 [110]. Dans la voie NF- κ B ce type de chaîne serait généré par l'E3 TRAF6 (K63) et l'E3 HUWE1 (K48) permettant un rôle de protection de la chaîne K63 de la dégradation par des déubiquitinases comme CYLD et ainsi une activation prolongée de la voie de signalisation NF- κ B [110].

Dans cette même voie de signalisation, les chaînes M1 et K63 ont clairement été montrées comme étant présentes sous la forme de chaînes mixtes ou de chaînes branchées

permettant une activation complète de celle-ci [247]. La formation de ces chaînes est dépendante de TRAF6 (K63) et de LUBAC (M1). Ces chaînes permettent de comprendre le rôle crucial que joue NEMO dans l'activation de cette voie qui présente à la fois par son domaine UBD NOA une sélectivité pour les chaînes M1 et par son domaine UBD NOAZ (NOA-linker-ZF) une sélectivité pour les chaînes K63. Elles expliquent également le rôle inhibiteur de la DUB CYLD qui est sélective à la fois des chaînes M1 et K63.

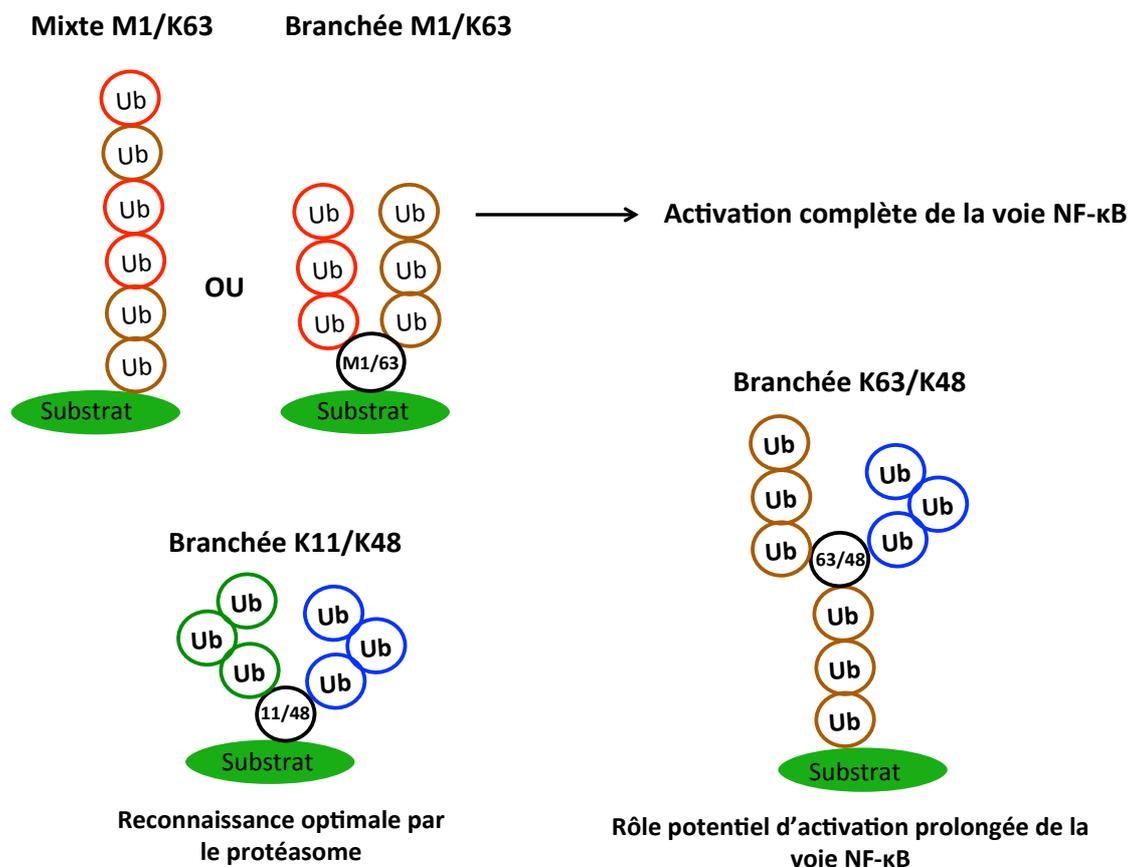


Figure 27 : Fonctions des chaînes d'ubiquitine hétérotypiques décrites

Les chaînes hétérotypiques appelées aussi hybrides sont présentes sous la forme de chaînes mixtes ou de chaînes branchées dans la cellule. La présence de chaînes hétérotypiques K63/M1 au sein de la voie NF-κB permet son activation complète. Les chaînes branchées K11/K48 constituent le signal optimal de reconnaissance par le protéasome. La présence de ces chaînes remet en question le rôle dégradatif des chaînes K11 homotypiques qui pourraient uniquement être présentes sous cette forme pour assumer cette fonction. Les chaînes branchées K63/K48 représentent 20% des chaînes K63 de la cellule. Elles semblent jouer un rôle de protection de la chaîne K63 (et M1) à la déubiquitinase CYLD afin de permettre une activation prolongée de la voie NF-κB.

Par ailleurs, il a été montré que les chaînes K11 peuvent être présentes avec des chaînes K48 au sein de chaînes branchées et que ces chaînes K11/K48 permettent une forte augmentation de la reconnaissance de la protéine modifiée par le protéasome [211, 248-250]. Le rôle dégradatif des chaînes homotypiques K11 a même été remis en cause par une étude récente qui révèle que ce type de chaînes est faiblement reconnu par le protéasome *in vitro*. De plus, différentes études mettent en évidence que le couple E3/E2 constitué de l'APC/C et de UBE2S, qui est connu pour catalyser spécifiquement des chaînes K11, formerait des chaînes K48/K11 en modifiant des chaînes K48 préalablement conjuguées à la protéine substrat [211, 248, 249].

Enfin, la nature des E3-ligases impliquées dans la formation des chaînes K6, K27, K29 et K33 qui n'assemblent pas uniquement ce type de chaînes, supporte l'idée que ces liens de polymérisation pourraient également être présents majoritairement au sein de chaînes hétérotypiques [251, 252].

Une étude récente a permis de montrer que des chaînes branchées K11/K63 sont impliquées dans l'endocytose efficace du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I [253]. Des chaînes mixtes K29/K48 ont également été observées et joueraient un rôle dans la dégradation protéasomale [81].

2. L'ubiquitine est modifiée par des modifications post-traductionnelles

L'ultime niveau de complexité du code de l'ubiquitine provient de la régulation de la protéine d'ubiquitine elle-même par différentes modifications post-traductionnelles (figure 28). Ces modifications peuvent avoir une implication directe sur les propriétés structurales de l'ubiquitine et ainsi sur sa fonction. Des études protéomiques ont montré que quasiment toutes les sérines et thréonines de l'ubiquitine peuvent être modifiées par phosphorylation [254-259] et toutes les lysines (sauf K29) par acétylation [260-263]. Ces méthodes peuvent cependant conduire à la formation d'artefacts et ne prennent pas en compte dans leur majorité l'abondance de la modification.

Néanmoins, pour l'acétylation, les modifications des lysines 6 et 48 sont détectables de façon significative dans la cellule [260]. L'intégration d'acides aminés non naturels portant la modification au sein de ces résidus montrent que celle-ci joue un rôle d'inhibition de la

réaction d'ubiquitination lors du transfert de l'E2/E3 vers le substrat [262]. Le rôle physiologique de l'acétylation de l'ubiquitine n'a cependant pas été encore mis au jour.

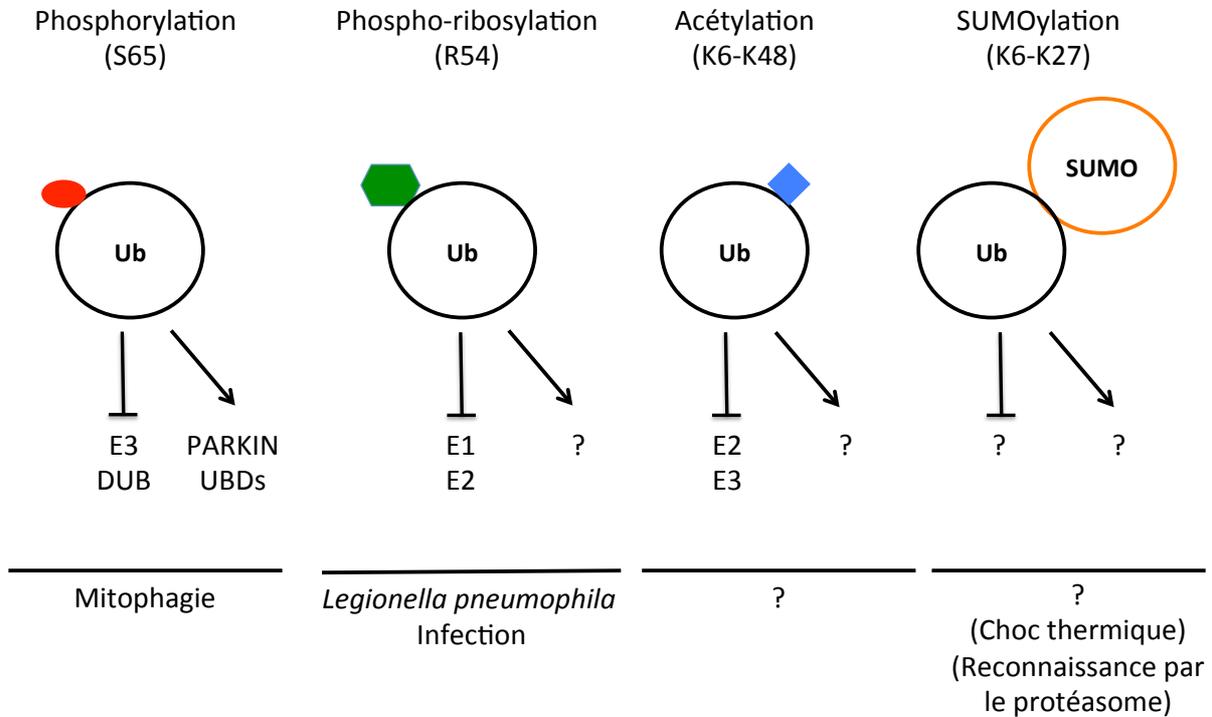


Figure 28 : Schéma représentant les différentes modifications post-traductionnelles de l'ubiquitine

Un rôle confirmé de la phosphorylation du résidu S65 de l'ubiquitine dans la mitophagie a été observé. La phospho-ribosylation de l'arginine 54 de l'ubiquitine a été mise en évidence dans le cas de l'infection par *Legionella pneumophila*. L'acétylation des lysines de l'ubiquitine a été détectée uniquement par spectrométrie de masse. Un rôle inhibiteur du transfert E2/E3 a été observé en conditions de surexpression d'ubiquitine acétylée. La SUMOylation de l'ubiquitine pourrait jouer un rôle dans la réponse cellulaire au choc thermique et dans la reconnaissance par le protéasome.

La phosphorylation de la sérine 65 de l'ubiquitine a clairement été identifiée comme jouant un rôle dans la dégradation de la mitochondrie par autophagie (mitophagie). Environ 20 % de l'ubiquitine mitochondriale est phosphorylée à cette position lorsque la mitochondrie est endommagée [242]. La première ubiquitine kinase, PINK1, fut identifiée. Celle-ci s'accumule à l'extérieur de la membrane de la mitochondrie lorsqu'elle est endommagée [264, 265]. L'ubiquitine phosphorylée sur la sérine 65 par PINK1 permet d'activer de façon allostérique l'E3-ligase PARKIN et de la recruter au niveau de la membrane externe [266]. Celle-ci génère au niveau de la membrane des chaînes d'ubiquitine de différentes natures, qui recrutent alors les récepteurs à l'ubiquitine comme NDP52, TAX1BP1 et OPTINEURIN

déclenchant le processus d'autophagie [267, 268]. Les propriétés structurales de l'ubiquitine sont modifiées par phosphorylation de la Ser 65 [269]. Un rôle inhibiteur de cette modification sur l'assemblage et le désassemblage des chaînes d'ubiquitine a également été observé pour un grand nombre d'E3 ligases et de DUB [269, 270].

Une étude récente a permis de mettre en évidence que l'ubiquitine peut être modifiée au niveau de l'arginine 54 par phospho-ribosylation par SdeA1, une protéine impliquée dans l'infection par *Legionella pneumophila* [271]. SdeA1 catalyse alors la réaction d'ubiquitination sur les sérines des protéines substrats. Cette modification de l'ubiquitine empêcherait la conjugaison de celle-ci sur les enzymes E1 et E2 et altérerait les fonctions cellulaires comme la reconnaissance par le protéasome, la mitophagie ou encore l'activation de la voie de signalisation liée au TNF.

Enfin des études protéomiques ont mis en évidence la présence de lysines d'ubiquitine modifiées par SUMOylation (K6, K11, K27, K48 et K63) [272-274]. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines « ubiquitin-like ». Bien que l'implication fonctionnelle de chaînes SUMO/ub soit méconnue, il a été observé une augmentation de la SUMOylation sur les lysines 6 et 27 de l'ubiquitine en réponse à un choc thermique et à une inhibition du protéasome [273, 275].

Chapitre 2 : division cellulaire, cytokinèse et

CEP55

PREAMBULE

La division cellulaire est le mécanisme qui permet la séparation d'une cellule mère en deux cellules filles. Par ce processus, les 10^{13} cellules constituant un organisme humain proviennent d'une seule et même cellule initiale [276]. Les cellules peuvent néanmoins entrer à la suite de leur division en phase de « non-division ». Le « choix » de la cellule vers un stade de division ou un stade de « non division » est finement régulé au sein de l'organisme et est dépendant de signaux extérieurs. Une grande partie des cellules humaines à l'âge adulte sont présentes à un stade de différenciation avancé et se divisent peu. Néanmoins, certaines cellules de notre organisme comme les cellules épithéliales présentent des propriétés de division active. Chez l'homme adulte, il y a environ 20 millions de divisions cellulaires par seconde qui permettent de remplacer les cellules perdues de façon continue [277].

Ainsi, la division cellulaire est essentielle, jouant un rôle déterminant notamment dans l'embryogénèse, la croissance générale de l'organisme, la régénération de certains tissus et la défense immunitaire. Par ailleurs, de nombreuses pathologies sont associées à une dérégulation de la division cellulaire comme par exemple les cancers. Les cellules cancéreuses se divisent de façon anarchique et ne perçoivent plus les signaux extérieurs permettant de limiter leur division. D'après des études de l'INCA (Institut National du Cancer) menées de 2004 à 2008, les cancers représentent la première cause de mortalité en France chez les hommes et la deuxième cause de mortalité chez la femme de 2004 à 2008.

Dans ce contexte, la compréhension moléculaire des phénomènes de régulation de la division cellulaire constitue un enjeu de taille. Mon projet de thèse qui a été financé par la Ligue Nationale Contre le Cancer vise à caractériser une protéine cruciale de la cytokinèse, la dernière étape de la division cellulaire, appelée CEP55 (*centrosomal protein 55 KDa*).

Dans cette partie, je rappellerai d'abord les différentes phases de la division cellulaire et du cycle cellulaire ainsi que ses mécanismes de régulation. J'expliciterai ensuite plus en détail le mécanisme de cytokinèse et particulièrement l'étape d'abscission qui consiste en la rupture finale du pont cytoplasmique entre les deux cellules filles. Je détaillerai également les liens qui existent entre le système de l'ubiquitine et les phases tardives de la cytokinèse. J'aborderai finalement les rôles de CEP55 dans la cytokinèse et dans d'autres fonctions cellulaires. Je terminerai en relatant les différentes pathologies qui sont associées à une dérégulation de l'activité de cette protéine.

I) La division cellulaire, la mitose et les phases précoces de la cytokinèse

A. Les phases du cycle cellulaire et la mitose

La division cellulaire est constituée de phases successives qui sont allouées à différentes fonctions (figure 29). La phase G1 (*growth1* ou *gap1*) est suivie de la phase S (*synthesis*) elle-même suivie de la phase G2 (*growth2* ou *gap2*). Ces trois phases appartiennent à l'interphase qui a un rôle de croissance et de préparation à la phase suivante qui, elle, est consacrée à la transmission du matériel génétique aux deux futures cellules filles. Cette phase est appelée mitose dans les cellules somatiques. Elle fait intervenir un processus différent dans les cellules germinales nommé méiose qui ne sera pas approfondi ici. La mitose (phase M) permet la séparation des chromosomes en deux lots identiques vers les deux cellules filles.

En début de phase G1, les cellules peuvent aussi sortir du cycle cellulaire et entrer dans une phase de quiescence G0. Les cellules quiescentes arrêtent de se diviser mais peuvent entrer de nouveau dans le cycle cellulaire au cours de leur vie. On distingue les cellules quiescentes qui sont dans un état réversible de « non-division » des cellules post-mitotiques qui sont à un stade terminal de différenciation [278].

Le passage d'un stade quiescent à un stade de division est régulé par une vaste panoplie de signaux extérieurs [279]. Ces signaux qui sont de différentes natures portent le nom générique

de facteurs mitogènes et anti-mitogènes. Il peut s'agir de molécules solubles, ou encore de contacts cellule-cellule qui inhibent la division cellulaire par un phénomène appelé inhibition de contact. Lorsque la balance facteurs mitogènes/facteurs anti-mitogènes est favorable à la division de la cellule, la cellule entre de nouveau en phase G1 et passe par un point de non-retour appelé point de restriction, à partir duquel la cellule est irréversiblement engagée dans un nouveau cycle de division [278].

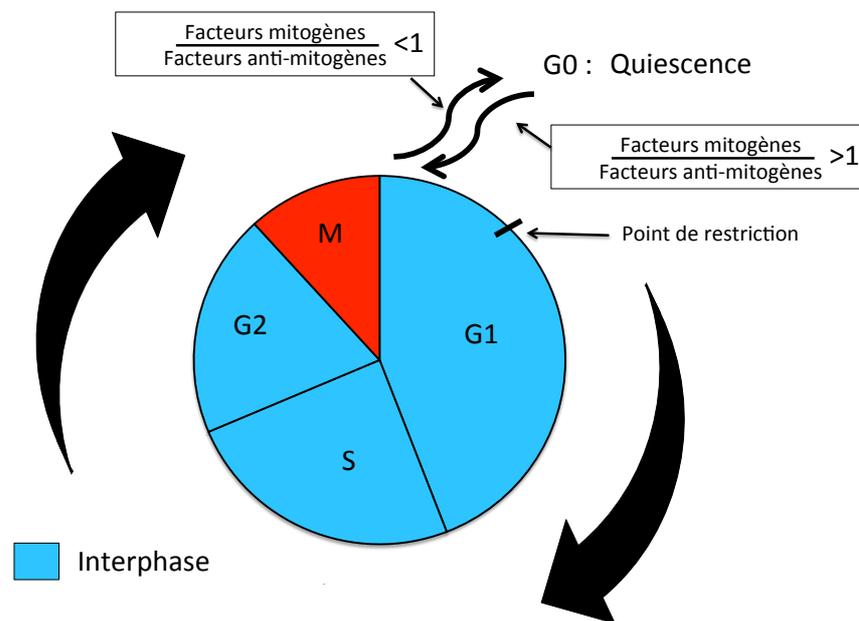


Figure 29 : Schéma représentant les différentes phases du cycle cellulaire
(Cf. texte)

La phase G1 est une phase de croissance qui est caractérisée par une forte expression génique, de traduction protéique et à une augmentation significative de la taille de la cellule. C'est souvent la phase la plus longue du cycle cellulaire. Durant la phase S, la cellule duplique son matériel génétique, par un mécanisme de réplication semi-conservatif. Suite à la réplication de l'ADN, la cellule entame une nouvelle phase de croissance G2, qui joue également un rôle de préparation à la mitose. La mitose est elle-même constituée de cinq principales phases différentes : la prophase, la pro-métaphase, la métaphase, l'anaphase et enfin la télophase. Les changements physiologiques majeurs qui se déroulent pendant les différentes phases de la mitose sont décrits dans la figure 30.

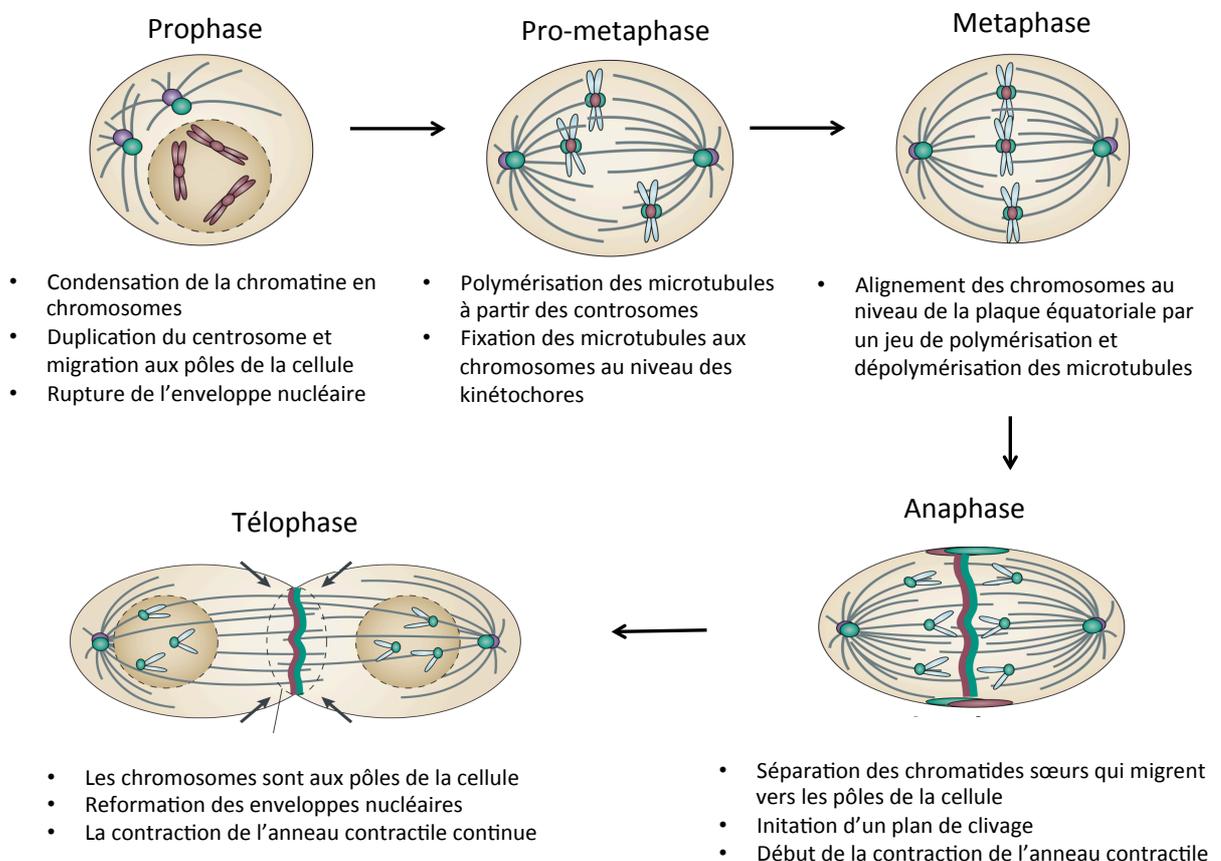


Figure 30 : Schéma représentant les différentes phases successives de la mitose

Inspiré de [280].

B. Les centrosomes et les microtubules : définitions

Le centrosome est un organe d'assemblage des microtubules, constitué de deux centrioles qui sont disposés de façon perpendiculaires et qui sont entourés d'une matrice péricentriolaire [277]. Les centrosomes se dupliquent en phase S. A partir du centrosome mère, un centrosome fille est synthétisé. En début de prophase, les centrosomes sont matures et migrent aux pôles de la cellule. Ils permettent la nucléation des microtubules, un composant du cytosquelette en se liant à leur extrémité (-). Cette liaison fait intervenir une tubuline particulière, appelée tubuline γ , présente au niveau du centrosome.

Les extrémités (+) des microtubules pointent alors dans différentes directions. On distingue alors le réseau de microtubules qui pointent vers la direction du pôle opposé,

appelés fuseau polaire, du fuseau astral. Les microtubules se lient par leur extrémité (+) au niveau d'une structure protéique complexe liée aux centromères des chromosomes appelés kinétochores.

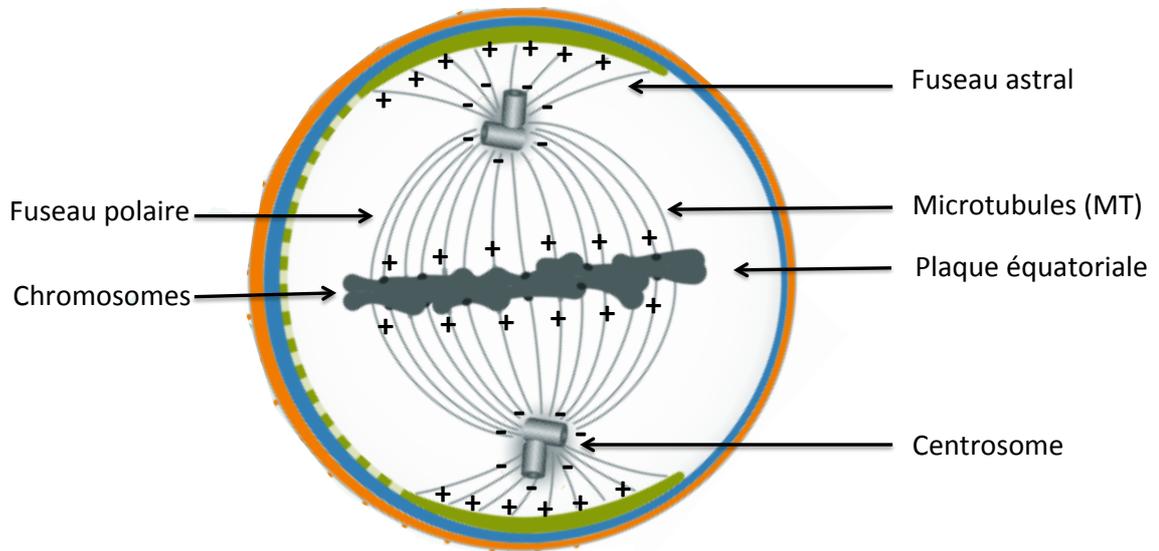


Figure 31 : Schéma simplifié des centrosomes et du réseau de microtubules en métaphase

Inspiré de [281]. Les centrosomes sont des centres de nucléation des microtubules par leur extrémité -. Le fuseau mitotique est composé des microtubules dont les extrémités + vont vers le centrosome opposé se différenciant du fuseau astral.

Les microtubules sont un assemblage non-covalent constitué d'hétérodimères de tubuline α et β . Les microtubules sont dans un état d'instabilité dynamique constant. A l'extrémité (+), ils se polymérisent plus vite qu'ils ne se dépolymérisent comparé à l'extrémité (-). Certaines protéines qui interagissent avec les microtubules (MAP) peuvent néanmoins les stabiliser ou les déstabiliser en modifiant ces propriétés aux deux extrémités.

C. La régulation du cycle cellulaire

1. Les complexes CDK/Cycline

Le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle cellulaire sont finement contrôlés. La compréhension des mécanismes moléculaires de régulation du cycle cellulaire a été couronnée par le prix Nobel de Physiologie ou Médecine qui a été attribué à Tim Hunt, Paul Nurse et Leyland Hartwell en 2001. Ils mirent en évidence pour la première fois l'existence de kinases CDKs (*cyclin dependent kinase*), de leurs sous-unités régulatrices, les Cyclines, ainsi que leurs fonctions capitales dans la régulation du cycle cellulaire.

Les CDKs sont constitutivement exprimées pendant toutes les phases du cycle cellulaire. En revanche, ces kinases ne sont actives que lorsqu'elles hétéro-dimérisent avec leur sous-unité régulatrice, les Cyclines. Comme leur nom l'indique, les Cyclines, elles, présentent un niveau d'expression qui varie fortement en fonction de la phase du cycle cellulaire [282]. Chez les mammifères, au moins six complexes majeurs CDK/Cyclines régulent le cycle cellulaire et interviennent à des moments distincts des différentes phases. CDK4 et CDK6, associées à la Cycline D, régulent le déroulement de la phase G1. Le dimère CDK2/Cycline E prend ensuite le relais permettant la transition G1/S suivi de CDK2/Cycline A qui assure le contrôle de la phase S. Le complexe CDK2/Cycline A régule la phase G2. Finalement, le complexe CDK1/Cycline B qui fut le premier découvert sous le nom de MPF (*mitosis promoting factor*) assure la transition G2/M et la mitose [283]. Son inactivation conduit ensuite à l'anaphase et à la sortie de la mitose. Il existe chez l'homme au moins 21 CDKs et 15 Cyclines différentes dont toutes les associations et les fonctions ne sont pas connues. Chaque couple CDK/Cycline présente une large panoplie de substrats qui leur est spécifique.

2. Les mécanismes de surveillance de la progression du cycle cellulaire

Un autre élément fondamental dans la compréhension des mécanismes intra-cellulaires de régulation du cycle cellulaire est la notion de point de contrôle ou « check-point ». L'idée en est la suivante. Une étape tardive du cycle ne peut avoir lieu que si une étape précoce a été

préalablement « validée » par la cellule. En d'autres termes, tant que la cellule n'a pas accompli correctement une étape particulièrement importante du cycle cellulaire, elle inhibe sa progression vers la phase suivante. Ces points de contrôle sont capables de détecter des anomalies et ainsi de déclencher l'arrêt du cycle cellulaire le temps de la régler. Une fois celle-ci réparée, la cellule peut franchir l'étape suivante. Lorsque l'anomalie est trop importante, ou que les mécanismes de réparation échouent, la mort programmée de la cellule est déclenchée par apoptose.

Cette notion de check-point fut d'abord proposée en 1989 par Hartwell et Weinert [284]. Un point de contrôle est présent lors de la transition G1/S qui se déroule au niveau du point de restriction. La cellule fait le « choix » entre rester en G0 ou franchir le point de restriction qui conduit celle-ci à un cycle de division supplémentaire. A la transition G2/M, le pré-requis pour passer ce stade est que l'ADN ait été bien répliqué au préalable et sans erreurs importantes. Si des erreurs sont détectées, un mécanisme de réparation des lésions de l'ADN est mis en place et la cellule n'entre pas en mitose tant que les erreurs ne sont pas corrigées. A la transition métaphase/anaphase, le point de contrôle SAC (*spindle assembly check-point*) vérifie que tous les chromosomes sont bien attachés aux microtubules du fuseau au niveau des kinétochores [285]. Lorsque c'est le cas, il « autorise » le passage à l'anaphase et à la sortie de mitose. « L'autorisation » de passer à l'étape suivante par les « check-points » représente en fait un ensemble d'évènements moléculaires complexes permettant de réguler, de façon robuste, le passage de la cellule à la phase suivante.

Par exemple, le point de contrôle SAC via la protéine Mad2 est inhibé lorsque le dernier chromosome est bi-orienté, conduisant à l'activation du complexe APC/C. APC/C déclenche alors directement l'anaphase et conduit également à la dégradation de la Cycline B. L'inactivation de CDK1 qui en découle conduit à un profond réarrangement du cytosquelette ainsi qu'à l'activation des protéines jouant un rôle dans l'initiation de la cytokinèse.

D. La cytokinèse : définition, vue d'ensemble et phases précoces

La cytokinèse ou cytodierèse qui peut être traduit du grec comme « mouvement des cytosols » est l'ensemble des processus physiologiques qui conduisent à la séparation cytoplasmique des deux cellules filles. Les mécanismes de cytokinèse varient en fonction des

espèces bien qu'elle garde certaines propriétés communes. Je décrirai ici uniquement la cytokinèse chez les métazoaires.

La cytokinèse commence en anaphase avec la spécification d'un plan de clivage perpendiculaire au fuseau polaire qui est dépendant de la formation d'un réseau de microtubules particulier, appelé fuseau central (figure 32). Celui-ci permet la formation au niveau du cortex de la cellule d'un anneau contractile d'actine et de myosine qui suit ce plan de clivage. La contraction centripète de l'anneau acto-myosique pince la membrane plasmique de l'intérieur grâce à des protéines qui stabilisent son adhésion à la membrane plasmique. Cela conduit finalement à la formation d'un pont intercellulaire entre les deux futures cellules filles. Ce pont contient notamment les microtubules du fuseau central dont les extrémités (+) se chevauchent au niveau d'une partie centrale appelée midbody ou corps intermédiaire.

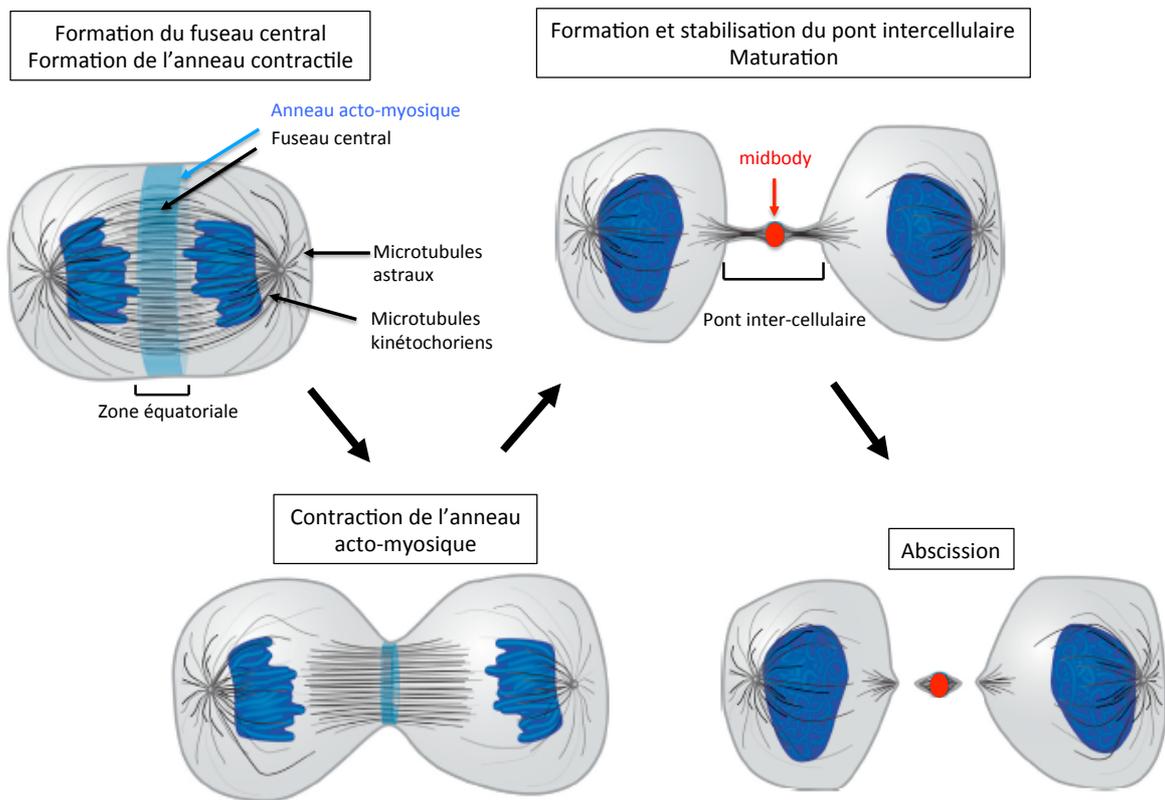


Figure 32 : Vue d'ensemble du processus de cytokinèse

Inspiré de [286].

Deux notions sont importantes ici. Premièrement, le pont intercellulaire doit être stabilisé par des contacts entre ses constituants internes et la membrane plasmique.

Deuxièmement, ce pont doit être mûri c'est-à-dire qu'un grand nombre d'évènements de recrutement, d'assemblages et de désassemblages protéiques se déroulent entre un pont néoformé et un pont intercellulaire mature qui est « prêt » pour l'abscission. L'abscission est l'ultime étape de la cytokinèse et correspond à la coupure du pont intercellulaire libérant les deux cellules filles [286, 287].

1. Spécification du plan de clivage

La spécification d'un plan de clivage est d'abord dépendante de la formation d'un réseau de microtubules centraux au sein du fuseau central qui doit être centré sur la zone équatoriale [288].

a. Formation du fuseau central

Le fuseau central correspond à un réseau complexe de microtubules antiparallèles et de protéines. Il est d'abord constitué des microtubules polaires non-kinétochoriens. Ces microtubules provenant de chaque pôle se chevauchent par leur extrémité (+) au niveau de la zone équatoriale. Il est ensuite constitué de microtubules se formant *de novo* à partir des microtubules polaires non-kinétochoriens. Ces microtubules, qui sont non-polaires et non-astraux, sont nucléés par le complexe Augmin [289-291]. L'ensemble, microtubules polaires non-kinétochoriens, microtubules non-polaires et non-astraux qui se chevauchent au niveau de la zone équatoriale et les protéines y étant associées, représente le fuseau central.

Plusieurs protéines s'associant aux microtubules permettent de stabiliser le fuseau central (figure 33A).

C'est le cas de la protéine PRC1 qui joue un rôle déterminant dans ce processus. Une fois que les phosphorylations inhibitrices induites par CDK1 et PLK1 sont levées en début d'anaphase, cette protéine homo-dimérise et se lie spécifiquement à l'interface entre deux microtubules anti-parallèles assurant la cohésion de l'ensemble du fuseau (figure 33B) [292-298].

Le complexe Centralspindlin, constitué de deux sous-unités de la kinésine MKLP1 (*Mitotic kinesin-like protein 1*) (ou de son isoforme CHO-1) et de la GTPase MgcRacGAP (*Male germ cell racGap*), joue également un rôle essentiel dans la stabilisation du fuseau central [299, 300]. Ce complexe est capable de former une structure oligomérique constituée de différentes sous-unités tétramériques essentielles pour la cohésion de tout le réseau microtubulaire au niveau de la zone équatoriale. Le recrutement du complexe Centralspindlin au niveau de la zone équatoriale ainsi que son état oligomérique sont finement régulés par un jeu de phosphorylations médiées par CDK1 et Aurora B. MKLP1, sous sa forme phosphorylée par CDK1, est séquestrée par la protéine 14-3-3 empêchant son homo-dimérisation ainsi que son recrutement au niveau de la zone équatoriale. En début d'anaphase,

MKLP1 est à la fois déphosphorylée sur son site CDK1 [301] et phosphorylée par Aurora B au sein du complexe CPC (*chromosomal passenger complex*) ce qui conduit à la perte d'interaction entre MKLP1 et 14-3-3 [302]. MKLP1 peut alors dimériser, être recrutée au niveau de la zone équatoriale et former au sein du complexe Centralspindlin des oligomères d'ordre supérieur [303, 304] (figure 33 B).

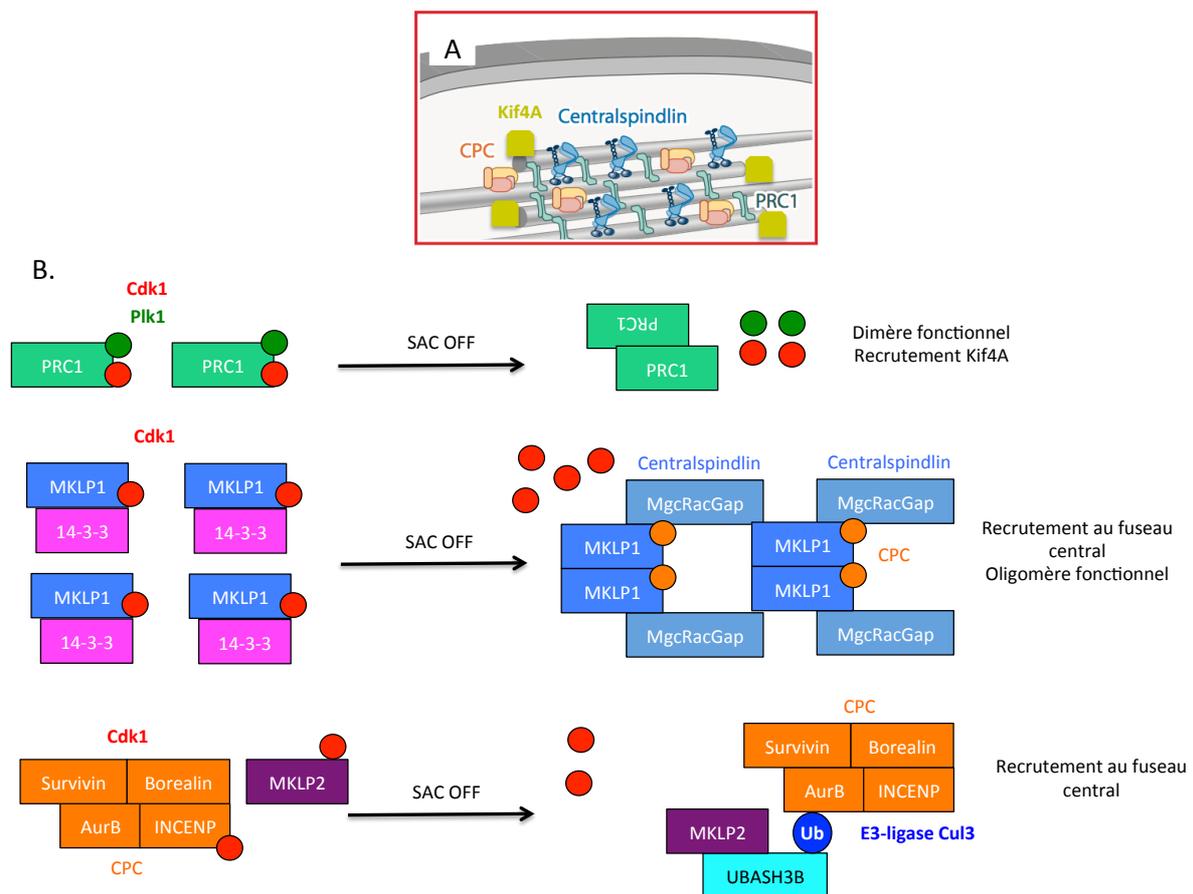


Figure 33 : Composition des protéines du fuseau central et leur régulation en début d'anaphase

A. Inspiré de [287]. Principales protéines stabilisant le fuseau central. **B.** En début d'anaphase, le recrutement et l'activation de ces protéines au fuseau central sont régulés par l'inactivation du SAC via un jeu de modifications post-traductionnelles (cf. texte).

Le complexe CPC constitué d'Aurora B, de Borealin, de Survivin et d'INCENP (*Inner centromere protein*) pourrait également jouer un rôle autre que la régulation par phosphorylation des composants du fuseau central. Il a été en effet suggéré que le CPC pourrait également directement stabiliser le faisceau de microtubules ([288, 305]. Le complexe CPC se localise au niveau des centromères des chromosomes en métaphase et se relocalise au niveau du fuseau central en anaphase. Cela fait intervenir la perte de la phosphorylation catalysée par CDK1 des protéines INCENP et MKLP2, une autre kinésine

[306]. De plus, cela fait également intervenir l'ubiquitination non dégradative d'Aurora B par l'E3 Cullin 3 qui est alors reconnue par la protéine récepteur à l'ubiquitine UBASH3B (*ubiquitin associated and SH3 domain containing*) complexée avec MKLP2 [307] (figure 33 B) .

Par ailleurs, la kinésine KIF4A (*kinesin family member 4A*) joue un rôle important dans la taille du fuseau central et est recrutée par PRC1 (*protein regulator of cytokinesis 1*) au niveau de la zone équatoriale. Il a été suggéré que KIF4A pourrait alors utiliser son domaine moteur pour se déplacer à l'extrémité (+) des microtubules. KIF4A inhibe l'élongation de ces microtubules limitant la taille du fuseau central [292, 297] permettant de maintenir le fuseau central centré au niveau de la zone équatoriale. Le complexe CPC semble également être impliqué dans l'activation de cette protéine [308].

Ainsi, la formation, la stabilisation du fuseau central ainsi que la régulation de sa taille et de sa position constituent des prérequis indispensables pour la spécification d'un plan de division.

b. La régulation de la protéine RHOA

Le positionnement du plan clivage au niveau de la plaque équatoriale est nécessaire à une bonne ségrégation des chromatides sœurs vers les pôles opposés. La spécification d'un plan de clivage se fait en début d'anaphase et est dépendante de la petite GTPase RHOA (*ras homolog gene family, member a*) qui est essentielle dans ce processus. Un gradient de la protéine RHOA activée se forme dans la cellule avec une accumulation de celle-ci au niveau du cortex (couche à proximité de la membrane plasmique) de la zone équatoriale.

Deux signaux redondants provenant à la fois du fuseau central et du fuseau astral sont essentiels dans la formation du gradient de RHOA activée [309, 310]. Le fuseau central contribue à l'activation de RHOA au niveau du cortex équatorial [311, 312]. Le fuseau astral, lui, est impliqué dans l'inactivation de RHOA au niveau de la région corticale proche des pôles de la cellule [310, 313, 314]. De plus, il a été proposé qu'une population de microtubules astraux particulièrement stables puisse activer RHOA au niveau de la zone équatoriale [313, 315]. Les mécanismes moléculaires de la régulation de RHOA par le fuseau astral n'ont cependant pas été identifiés (figure 34A).

Les petites GTPases qui hydrolysent le GTP (*guanosine triphosphate*) en GDP (*guanosine diphosphate*) sont en général actives lorsqu'elles sont liées au GTP et inactives lorsqu'elles se lient au GDP [316]. Elles sont inhibées par les protéines activatrices des GTPases (GAP) qui favorisent l'hydrolyse du GTP en GDP. Les facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (GEF) peuvent les activer en remplaçant le GDP par une molécule de GTP. Un activateur essentiel de RHOA est la GEF ECT-2 (*epithelial cell transforming 2*) qui est recrutée au niveau de la zone équatoriale en interagissant avec le complexe Centralspindlin et plus particulièrement avec la GAP MgcRacGap après la phosphorylation de cette dernière par PLK1 (*polo-like kinase 1*) [312, 317-319]. L'inactivation de CDK1 permet à ECT-2 de se relocaliser préférentiellement dans la zone corticale de l'équateur conduisant à l'activation préférentielle de RHOA dans cette zone [320] (figure 34B).

Le rôle des GAPs au niveau de la zone équatoriale n'a pas été clairement identifié. Néanmoins, MgcRacGap qui présente une faible affinité pour le GTP de RHOA ne semble pas inhiber directement cette dernière [321], ou si c'est le cas de façon moins efficace que la GEF ECT-2 ne l'active. Plusieurs études montrent qu'au contraire l'activité GAP de MgcRacGap (qui est distincte de son rôle de recrutement d'ECT-2) contribue à l'accumulation de RHOA activée au niveau du cortex équatorial [322, 323]. Son activité GAP pourrait réguler positivement la GEF ECT-2. Un rôle inhibiteur par l'activité GAP de MgcRacGap de la GAP Rac1 (*rac family small gtpase 1*) a également été décrit, ce qui pourrait expliquer son implication dans l'accumulation de la protéine RHOA activée au cortex équatorial [321, 324] (figure 34C).

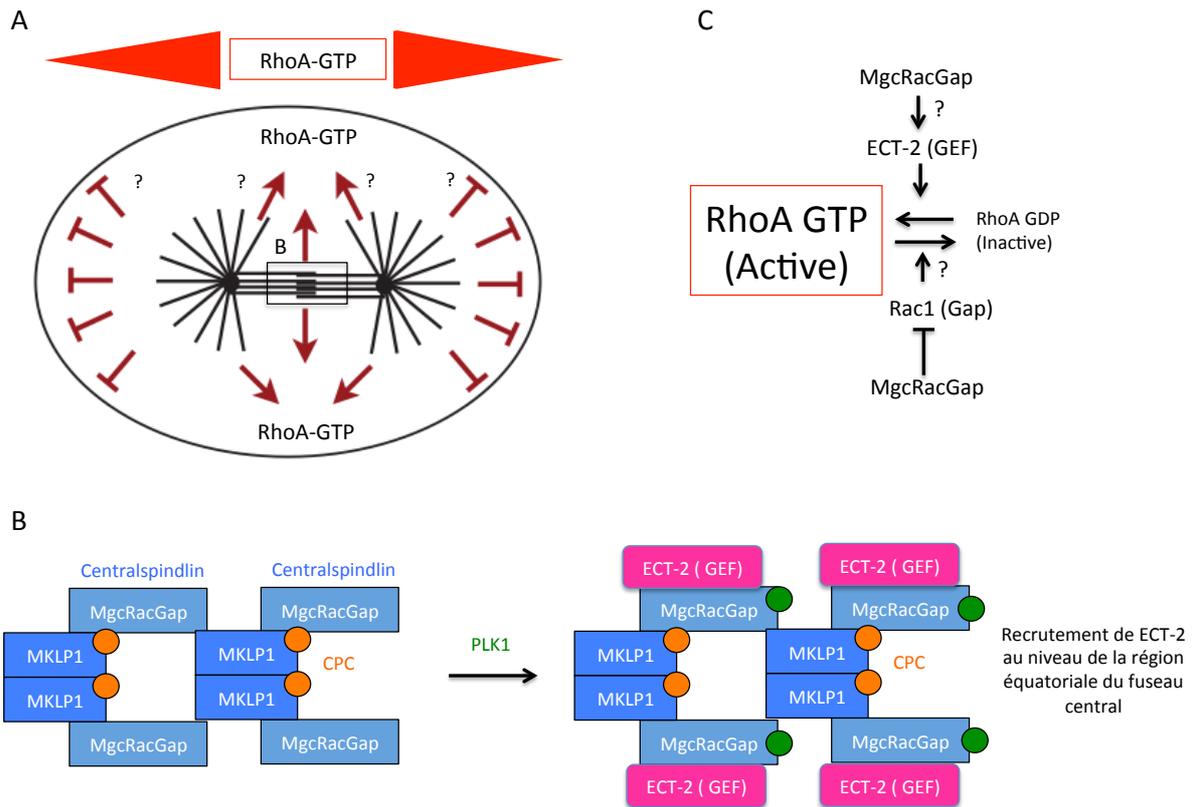


Figure 34 : Formation d'un gradient de RHOA activée au niveau de la région équatoriale centrale

A. Inspiré de [325]. Vue générale des acteurs conduisant à la formation d'une accumulation de RHOA activée. Le fuseau central et le fuseau astral jouent un rôle essentiel même si la base moléculaire de ce processus n'est pas connue pour le fuseau astral. **B.** Recrutement de ECT-2 au niveau du fuseau central par le complexe Centralspindlin suite à sa phosphorylation par PLK1. **C.** En plus de son rôle de recrutement de la GEF ECT-2, MgcRacGap régule positivement la formation de RHOA activée. Elle activerait ECT-2 inhiberait une GAP qui pourrait être impliquée dans l'inactivation de RHOA comme par exemple Rac1.

La forte concentration locale de RHOA activée sous la membrane plasmique au niveau équatorial constitue le signal de spécification majeur du plan de division et permet la formation et la contraction de l'anneau contractile.

2. Formation et contraction de l'anneau contractile

RHOA préférentiellement activée au niveau du cortex équatorial dirige l'assemblage et la contraction de l'anneau actino-myosique en activant deux cascades de signalisation différentes. L'une est impliquée dans la nucléation de l'actine et l'autre est impliquée dans

l'activation de la myosine II, la composante motrice, qui est indispensable à la contraction de l'anneau acto-myosique [326].

Premièrement RHOA recrute par interaction directe la formine mDia2 qui est une enzyme impliquée dans la polymérisation de chaînes linéaires d'actine - ou filamenteuses - à partir des monomères d'actine globulaire (figure 35) [327, 328]. La synthèse d'actine filamenteuse au sein de l'anneau fait également intervenir la profilline qui interagit avec mDia2 [329, 330].

Deuxièmement, RHOA active la myosine II indirectement en activant la kinase ROCK (*rho associated coiled-coil containing protein kinase*) qui phosphoryle spécifiquement la chaîne légère de la myosine et en inhibant la phosphatase MYPT (*myosin phosphatase targeting protein*) qui contrebalance l'activité de cette kinase sur la myosine II [331]. Ceci stimule la contraction de la myosine II au sein de l'anneau (figure 35).

Le mécanisme moléculaire permettant l'assemblage et la contraction de l'anneau acto-myosique n'est pas bien compris mais est dépendant de l'activation préférentielle de ces deux voies au niveau du cortex équatorial par RHOA.

Le processus de constriction du sillon de division fait intervenir un jeu complexe de polymérisation d'actine, de contraction des filaments par la myosine II mais également de dépolymérisation des filaments d'actine. En effet, il a été montré que l'anneau acto-myosique se désassemble à la même vitesse que la constriction du sillon de division, c'est-à-dire que l'anneau maintient la même quantité d'actine et de myosine II par unité de volume de membrane plasmique en début (diamètre élevé de la cellule) et en fin de processus (diamètre faible de la cellule) [332, 333].

De plus, l'anneau acto-myosique doit être fortement ancré à la membrane plasmique pour permettre la formation du sillon de division. Un autre rôle de RHOA activée est de recruter préférentiellement l'Anniline au niveau de la membrane plasmique (figure 35). L'Anniline, qui est une protéine plateforme se liant à différents partenaires, se lie notamment à l'actine et à RHOA jouant un rôle de stabilisation de l'anneau contractile à la membrane plasmique [334-336]. Une étude récente montre que cette protéine est capable d'interagir avec les lipides suggérant un rôle de celle-ci dans l'ancrage de l'anneau à la membrane plasmique [337].

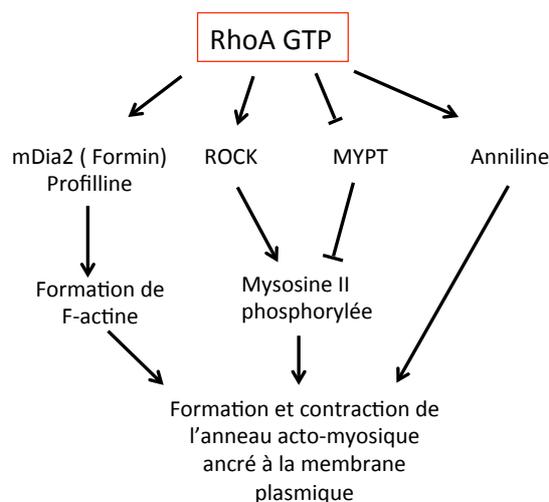


Figure 35 : Voies activées par RHOA-GTP afin de stimuler la formation de l’anneau acto-myosique, sa contraction et son ancrage à la membrane plasmique

(Cf. texte)

D’autres acteurs jouent un rôle important dans la contraction de l’anneau acto-myosique.

Le fuseau central joue un rôle important dans la constriction de l’anneau acto-myosique. Notons par exemple, comme expliqué précédemment, que MgcRacGap inhibe la GAP Rac1 [324]. Rac1 active la voie Wasp (*wiskott-aldrich syndrome protein*) –Wave (*WASP-family verprolin-homologous protein*) /Arp2-3 (*actin-related protein 2-3*) connue pour former des sites de branchage sur les actines filamentaires. MgcRacGap permet ainsi de maintenir un anneau présentant un réseau filamentaire anti-parallèle non branché d’actine.

La coffiline, jouerait un rôle sur la dynamique du réseau d’actine par son activité de coupure des filaments d’actine [338].

Les septines (SEPT), qui peuvent aussi être considérées comme le quatrième composant du cytosquelette, sont capables de se lier aux lipides et sont localisées au niveau de l’anneau contractile [339]. SEPT2, SEPT7 et SEPT11 jouent un rôle déterminant dans la cohésion entre l’anneau acto-myosique et la membrane plasmique ainsi que dans la courbure de l’anneau contractile comme cela a été observé chez la drosophile [340].

La Moesine présente au niveau de la zone équatoriale se lie également à l’actine et à la membrane plasmique [341].

Enfin, la contraction de la membrane plasmique au niveau du sillon nécessite une augmentation constante de la surface de la membrane plasmique. Le trafic vésiculaire y joue

un rôle crucial en apportant les lipides nécessaires. De plus, un grand nombre de protéines pré-citées sont capables d'assurer l'adhésion entre l'anneau acto-myosique et la membrane plasmique en se liant directement aux lipides au niveau de la zone équatoriale. La membrane plasmique dans cette région est fortement enrichie en lipides particuliers de la classe des phosphoinositides qui jouent un rôle important particulièrement dans les étapes plus tardives de la cytokinèse. Parmi eux, les phosphatidylinositol 4-5 bis-phosphates ont été identifiés comme étant les acteurs principaux de la cohésion entre la membrane plasmique et l'anneau acto-myosique pendant la contraction de l'anneau acto-myosique, même si leur rôle n'est pas essentiel durant ce processus [342].

Finalement, l'anneau acto-myosique formé se contracte et se resserre autour du fuseau central conduisant à la formation du pont-intercellulaire.

II) Les phases tardives de la cytokinèse : de la formation du pont intercellulaire à l'abscission

L'ingression du sillon conduit à la formation d'un pont intercellulaire qui relie les deux futures cellules filles avec en son centre une structure particulière appelée midbody ou corps intermédiaire. Le midbody est essentiel dans la régulation des phases tardives de la cytokinèse en permettant notamment de stabiliser le pont intercellulaire et jouant le rôle de plateforme de recrutement à la machinerie d'abscission.

Le pont intercellulaire reste connecté entre les deux cellules pendant plusieurs heures. De façon surprenante, les cellules continuent leur cycle cellulaire et entrent en G1 et peuvent même aller jusqu'en G2 alors qu'elles sont toujours connectées par celui-ci [343]. Il a même été proposé récemment que l'abscission soit considérée comme une phase à part entière de la G1, l'étude montrant en effet que l'abscission se déroulait dans 90 % des cas en G1[344].

Pour ma part, je définis la cytokinèse comme étant le processus conduisant à la division cytoplasmique des cellules et non comme une phase de la division cellulaire, puisque par définition elle commence en anaphase et se termine dans le cycle de division suivant.

Dans les HeLa la durée théorique du pont intercellulaire a été estimée à 3-4 heures mais varie expérimentalement entre 3 et 8 heures en fonction de la cellule (un cycle de division est d'environ 24 heures dans les HeLa) [345]. On peut se demander, d'un point de

vue évolutif, si la persistance si longue du pont intercellulaire présente un avantage sélectif aux cellules ou si elle est due à la difficulté technique du mécanisme d'abscission. Sûrement les deux.

Un des premiers rôles qui furent attribués au pont intercellulaire est une fonction de communication directe entre les deux cellules connectées permettant la diffusion de molécules d'une cellule à l'autre [343]. De plus, comme nous le verrons dans la partie dédiée à CEP55, certaines cellules spécialisées inhibent l'abscission permettant la formation de syncytia.

D'autre part, l'abscission constitue une réelle prouesse technique, le pont devant être longuement mûri avant d'atteindre un état opérationnel [346]. Il doit être stabilisé en permanence, mais ses constituants « encombrants » doivent être au préalable dégradés pour permettre le mécanisme d'abscission. Un grand nombre de protéines et de lipides y sont recrutées dans un ordre précis et relocalisées à des positions précises durant le processus. Enfin, le mécanisme d'abscission en lui-même fait notamment intervenir des modifications de la taille du pont intercellulaire et l'assemblage de filaments complexes d'ESCRT-III, l'acteur final du processus.

La variabilité de la durée du pont intercellulaire entre les différentes lignées cellulaires et au sein de la même population cellulaire ainsi que sa composition changeante en fonction du temps rendent son étude difficile. Bien que ces dernières années aient permis de mettre en évidence de nombreux mécanismes moléculaires, la compréhension moléculaire du processus de cytokinèse tardif et sa régulation dans le temps restent largement incomprises.

A. L'architecture globale du pont intercellulaire et du midbody

Lorsque l'anneau acto-myosique atteint une taille d'environ $2 \mu\text{m}$, il finit par contacter le fuseau central [347]. Se forme alors le pont intercellulaire avec en son centre une structure, le midbody (figure 36). Des images de microscopie électronique révèlent une structure extrêmement dense aux électrons qui se distingue du reste du pont intercellulaire traduisant une forte densité protéique. Le midbody est un peu plus large que le reste du pont intercellulaire dans sa partie centrale et présente une morphologie ovoïde. Au long de sa maturation, l'ensemble du pont diminue de diamètre (environ d'un facteur 2) et s'allonge.

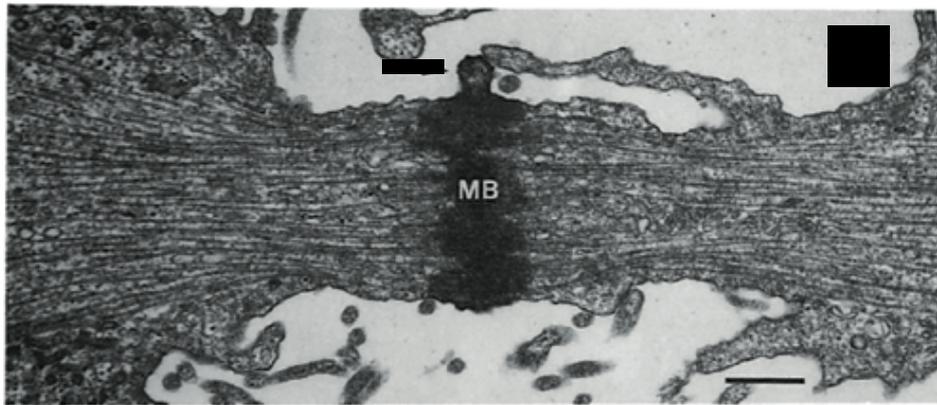


Figure 36 : Structure du pont intercellulaire et du midbody

Extrait de [347]. Image d'un pont intercellulaire après sa formation par microscopie électronique à transmission. MB : midbody ; Echelle : 0,5 μm .

Le midbody a pu être subdivisé en différentes régions en fonction de la localisation des différentes protéines au sein de celui-ci. Ces délimitations ainsi que les noms qui leur sont associés varient abondamment dans la littérature. Pour ma part, je propose ici une cartographie du midbody approximative permettant de situer *grosso-modo* les protéines au sein de cette structure (Figure 37). J'ai divisé le midbody en 2 régions distinctes, la région centrale et la région périphérique. Au sein de ces deux régions, on peut encore distinguer deux sections distinctes : la section microtubulaire du fuseau central et l'espace entre la membrane plasmique et le fuseau central, appelé espace cortical (qui a été volontairement amplifié dans la figure 37).

Aussi, au sein de la zone centrale, la section microtubulaire est communément nommée « dark-zone » ou zone noire et elle correspond à la zone où la majorité des microtubules se chevauchent au sein du midbody. La « dark-zone » est tellement dense en protéines qu'elle empêche tout immuno-marquage rendant compliqué l'identification des protéines la constituant [348]. Les protéines telles que PRC1 et KIF4 ont pu être identifiées dans cette zone et sont majoritairement présentes aux extrémités de celle-ci permettant de jouer un rôle de stabilisation du faisceau microtubulaire [349].

Le réseau microtubulaire varie également entre les différentes régions du pont intercellulaire. Brièvement : ces microtubules étant issus du fuseau central, ils sont disposés

de façon anti-parallèle, leur extrémité (+) pointant vers la cellule opposée. Une étude utilisant de la cryomicroscopie électronique couplée à de la tomographie a montré qu'il existait trois types de microtubules au sein du pont [350]. Des microtubules provenant des futures cellules filles mais également des microtubules formés *de novo* au sein du fuseau central qui se chevauchent au niveau de la partie centrale du midbody. Enfin, d'autres microtubules provenant des cellules filles traversent entièrement le midbody. Ainsi, schématiquement, plus on s'éloigne de la région centrale du midbody, plus on se rapproche du cytosol des futures cellules filles et moins le réseau microtubulaire est dense. Ces microtubules sont très stables grâce à leur actéylation massive [351, 352]. D'ailleurs cette modification est souvent utilisée pour marquer le pont intercellulaire de façon spécifique.

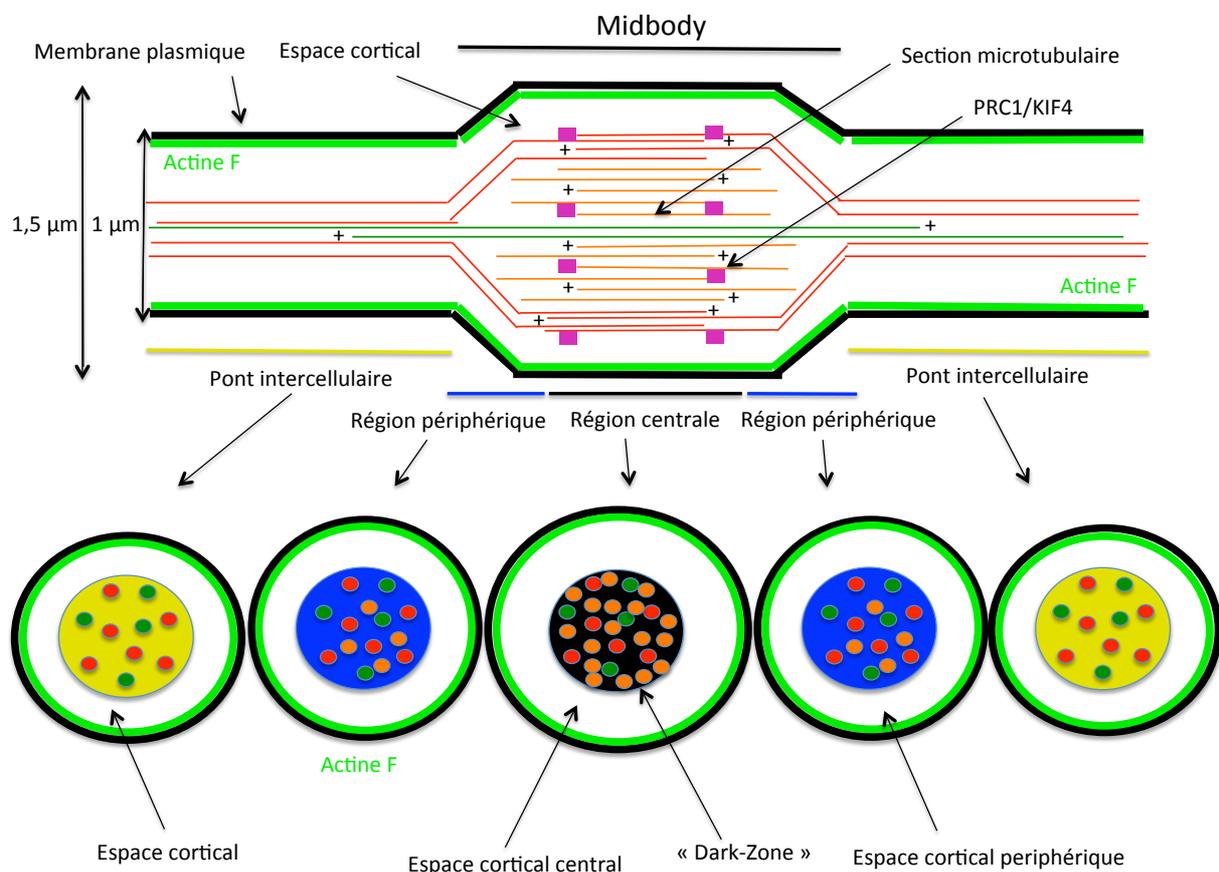


Figure 37 : Cartographie schématique du pont intercellulaire et du midbody

Le midbody peut être séparé en différentes zones en fonction des localisations différentes des protéines le constituant. Les régions proposées sont approximatives et délimitent les différentes zones au sein du midbody et du pont intercellulaire. La dimension de l'espace cortical a été volontairement amplifiée. (Cf. texte).

L'espace cortical central est la zone où la majorité des protéines ont été identifiées. On y trouve l'anneau acto-myosique qui est dépolymérisé au cours du processus de maturation du pont intercellulaire [353], ainsi que les protéines lui étant associées telles que les septines, l'Anniline, la Moesine, RHOA, ARF6 (*ADP-ribosylation factor 6*) et la kinase Citron qui a été recrutée pendant la contraction de l'anneau. [349, 354, 355].

Par ailleurs, le Centralspindlin se localise également dans cette zone avec CEP55 qui est recrutée après la formation du pont intercellulaire [356-358]. Néanmoins, ces protéines couplées à un tag fluorescent ont également été observées au niveau de la « dark-zone » même si l'intensité de fluorescence y semble moins forte que dans l'espace cortical central [358].

Lors de la structuration du midbody, les protéines Aurora B au sein du complexe CPC et MKLP2 se re-localisent au niveau du midbody dans la partie la plus externe du midbody et leur localisation s'étend également jusqu'à une partie flanquant le midbody au sein du pont intercellulaire [349, 355, 356, 359].

Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, le gradient de RHOA de la région corticale équatoriale vers la région corticale polaire a permis de former l'anneau acto-myosique et sa contraction. Cependant, l'actine se polymérise dans tout le cortex cellulaire bien qu'elle soit présente préférentiellement au niveau de l'équateur. Ainsi, une fois le pont formé une grande partie d'actine filamentaire se retrouve au niveau de l'espace cortical du pont intercellulaire.

B. La formation du midbody et la stabilisation du pont intercellulaire

La formation du midbody se fait par une interaction entre le fuseau central et la membrane plasmique permettant de créer l'espace cortical central du midbody.

Le trafic vésiculaire joue un rôle clé dans la formation du midbody ainsi que dans la stabilisation du pont intercellulaire. Pendant la contraction de l'anneau acto-myosique et une fois le pont formé, la GTP-ase ARF6 est recrutée via des endosomes de recyclage contenant la protéine Rab11[360]. De plus, les endosomes contenant la GTPase Rab35 permettent

d'apporter dans les phases précoces de la cytokinèse les enzymes modifiant les lipides au niveau de la membrane plasmique équatoriale comme par exemple la kinase PI5K (*phosphatidylinositol 5-kinase*) ce qui conduit à l'accumulation de phosphatidylinositol-4, 5 bisphosphate (PI4,5P2) dans cette zone [361]. La septine 2 est également adressée dans la zone corticale équatoriale par ces vésicules [361]. Le rôle de ces différentes protéines dans la formation et la stabilisation du pont sont explicités ci-après et résumés dans la figure 38.

L'anniline a été décrite comme particulièrement importante dans la formation du midbody et dans la stabilité du pont. Dans les cellules de *Drosophile* S2, il est possible de stabiliser la cohésion de la membrane plasmique avec l'anneau acto-myosique de façon indépendante de l'anniline. En effet, la déplétion de l'anniline n'altère pas directement la formation du sillon de division, mais conduit à la formation d'un pont intercellulaire qui se relâche environ 10 minutes après sa formation ([355, 362, 363]. La capacité de l'Anniline à interagir à la fois avec l'actine et les septines semble être nécessaire à la formation de l'espace cortical central du midbody [364, 365]. Un mutant tronqué dans son domaine d'interaction aux septines permet la formation de l'espace cortical central du midbody, mais la membrane plasmique se relâche rapidement et conduit à des défauts de cytokinèse. La déplétion des septines (SEPT 2-7-11) conduit au même phénotype montrant le rôle essentiel de ces deux protéines dans la formation de l'espace cortical central du midbody [366, 367]. Par ailleurs, ces deux types de protéines interagissent avec les phosphoinositides (PI4,5P2) et cette interaction est importante dans la bonne localisation de ces protéines au niveau du pont intercellulaire [342, 361, 368].

La kinase Citron qui se localise également au niveau de l'espace cortical central du midbody [369] fut d'abord identifiée comme étant impliquée dans la localisation correcte de l'anniline et de RHOA dans cette zone [354, 370, 371]. Une déplétion de cette protéine conduit à une mauvaise localisation de ces deux protéines qui sont alors localisées de façon plus diffuse au sein de l'ensemble de l'espace cortical du pont intercellulaire conduisant à un défaut de cytokinèse. Plusieurs études plus récentes montrent que la kinase Citron joue également un rôle fondamental en interagissant avec MKLP1 et une autre kinésine KIF14 présentes au niveau du fuseau central [372-374]. Ces deux kinésines interagissent avec PRC1 [372, 373, 375]. Ainsi la kinase Citron fait le lien entre les protéines associées à la membrane plasmique en interagissant avec l'anniline et les protéines du fuseau central permettant la formation de l'espace cortical central du midbody. Par ailleurs, ces contacts sont maintenus

également après la dépolymérisation de l'anneau acto-myosique permettant d'assurer la stabilité du pont intercellulaire jusqu'à l'abscission.

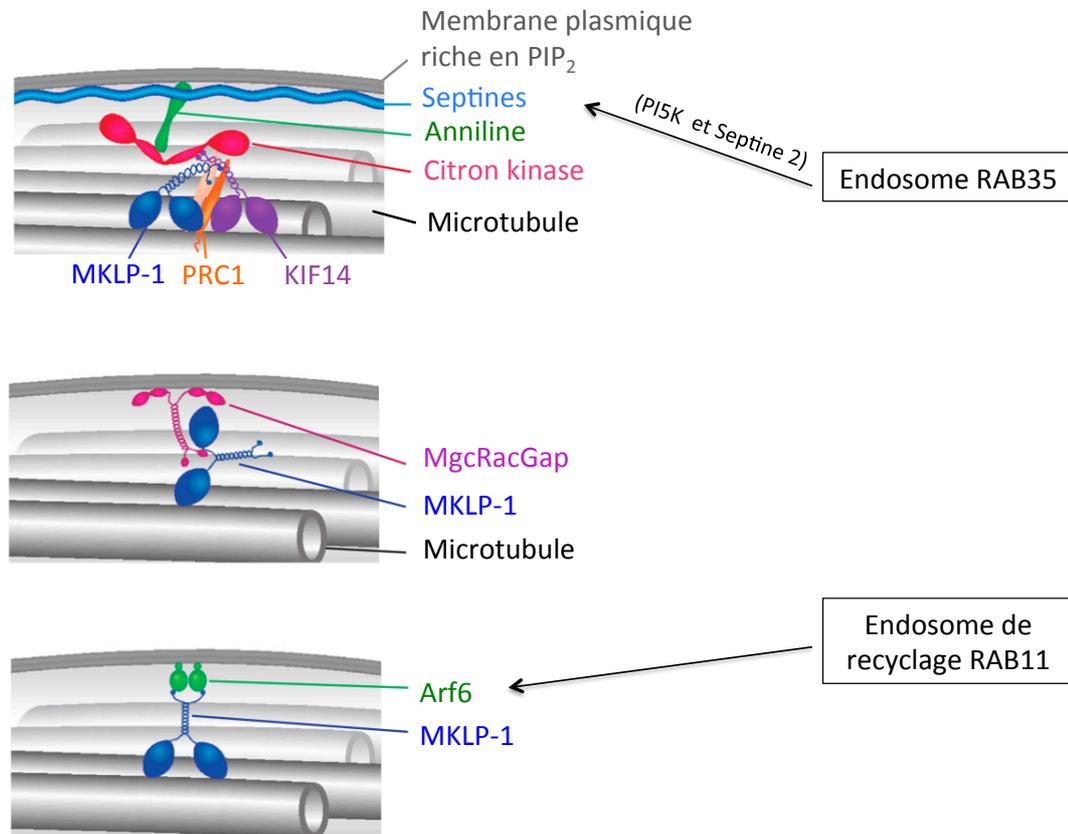


Figure 38 : Schéma représentant les différents types d'interaction permettant la structuration du midbody et la stabilité du pont intercellulaire

Inspiré de [286]. Le trafic vésiculaire est capital dans la stabilisation du pont intercellulaire et dans la formation du midbody dans les phases précoces de la cytokinèse en apportant des lipides particuliers et des protéines effectrices. Le complexe Centralspindlin est constitué de MKLP1 et de MgcRacGap. Il joue un rôle crucial dans la stabilisation du pont intercellulaire. (Cf. texte pour la description des complexes)

Par ailleurs, d'autres implications du Centralspindlin dans la formation du midbody et dans la stabilisation du pont ont été mises en évidence. En effet, un domaine C1 au sein de la protéine MgcRacGap a été identifié interagissant sélectivement avec les lipides phosphatidylinositol-4-phosphate (PIP4P) et phosphatidylinositol-4, 5 bisphosphate (PI4,5P2) *in vitro* [376]. En utilisant une protéine de fusion fluorescente couplée au domaine C1, il a été observé un décrochage de celui-ci au niveau du pont lorsqu'il était traité avec des phosphatases spécifiques de ces lipides. En outre, des mutations dans ce domaine basées sur

sa structure cristallographique abolissent l'interaction à ces lipides *in vitro* et conduisent à un défaut drastique de stabilité du pont intercellulaire dans les phases précoces de sa formation.

De plus, MKLP1 présente un domaine d'interaction à la GTPase ARF6 [377]. ARF6 est modifiée par un groupement myristoyl lui permettant de s'ancrer à la membrane plasmique et présente, en plus, un domaine PH qui est un domaine de liaison aux phosphoinositides [378]. L'interaction entre MKLP1 et ARF6 qui est liée à la membrane plasmique joue ainsi un rôle déterminant dans la stabilité du pont intercellulaire.

Rappelons également que le complexe Centralspindlin est capable de former des oligomères d'ordre supérieur qui peuvent ainsi probablement se lier en même temps à la membrane plasmique et à la kinase Citron par avidité, augmentant la cohésion entre le réseau microtubulaire et la membrane plasmique.

Ainsi, le pont intercellulaire est stabilisé dès sa formation jusqu'au processus d'abscission. Cela permet de préparer l'étape d'abscission selon différents procédés d'assemblage et de désassemblage de protéines et de modifications du diamètre du pont que l'on regroupe sous le nom de maturation du pont intercellulaire.

C. Maturation du pont intercellulaire et abscission

Différentes études montrent que le site d'abscission est éloigné du midbody (environ 1 μM) [347, 353]. Une structure hélicoïdale fibrillaire de 17 nm est observée au niveau du site de l'abscission. La présence de ces fibres de 17 nm est dépendante de la machinerie ESCRT et plus particulièrement des ESCRT-III (figure 39).

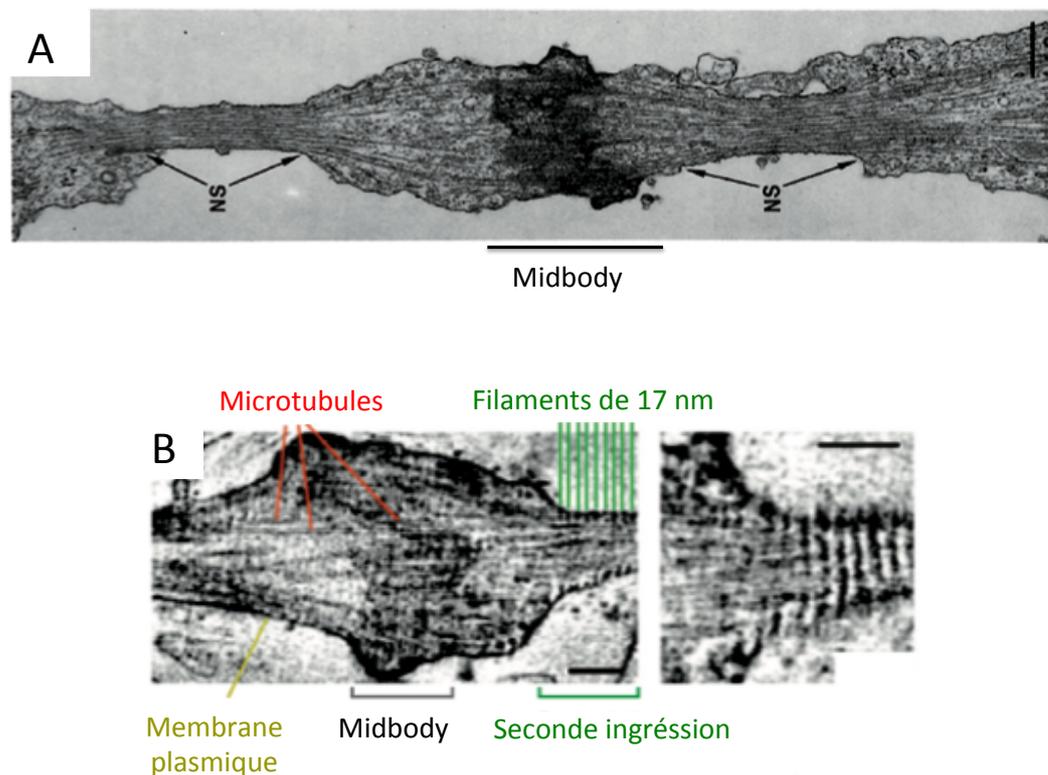


Figure 39 : Seconde ingression et filaments de 17 nm en fin de processus de maturation du pont intercellulaire

A. Images de microscopie électronique à transmission du pont intercellulaire révélant une zone de constriction (seconde ingression) de chaque côté du midbody [347]. **B.** Des images de microscopie électronique à transmission après congélation des échantillons sous haute pression révèlent la présence des filaments de 17 nm au niveau de la seconde ingression avant l'abscission [353].

Néanmoins, les ESCRT-III s'assemblent dans des objets de la taille d'environ (0,05-0,2 μM) ce qui n'est pas compatible avec le diamètre du pont intercellulaire (environ 1 μM pour un pont mature). De plus, de nombreuses études ont montré que pour permettre l'abscission deux éléments « encombrants » doivent être au préalable retirés du pont : les filaments d'actine et les microtubules. Le modèle actuel d'abscission le plus répandu fait intervenir deux acteurs majeurs qui sont interconnectés jouant des rôles complémentaires [286, 287, 379].

Le trafic vésiculaire permet à la fois de dépolymériser l'actine au niveau du pont et de créer un second site d'ingression au niveau du site d'abscission par fusion de vésicules. La taille du pont à ce niveau est alors réduite à environ (0,1- 0,2 μM) [380] (figure 39).

En parallèle, le midbody recrute la machinerie ESCRT permettant aux ESCRT-III de former ces filaments au niveau de la 2^{ème} ingression où ils médient la coupure des microtubules et le phénomène de fission membranaire final.

1. Le trafic vésiculaire : dépolymérisation de l'actine et formation de la seconde ingression

Outre son rôle dans la contraction de l'anneau acto-myosique et la stabilisation du pont intercellulaire, le trafic vésiculaire joue également un rôle clé dans les étapes de maturation du pont intercellulaire requises pour l'abscission résumés dans la figure 40.

L'idée d'un rôle important du trafic vésiculaire dans le processus d'abscission provient de l'observation de la persistance, après la formation du pont intercellulaire, de l'appareil de Golgi et des endosomes de recyclage à proximité de celui-ci dans chaque future cellule fille [347, 381, 382].

Un grand nombre de protéines associées à la fusion vésiculaire sont impliquées dans le processus d'abscission. Le complexe octamérique Exocyst est connu pour son rôle d'ancrage des vésicules endosomales à la membrane plasmique. Ce processus est suivi de la fusion des membranes de l'endosome et de la membrane plasmique qui est facilitée par les protéines de la famille SNARE (*soluble n-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). De façon intéressante, de nombreuses sous-unités du complexe Exocyst [383-386] et des protéines de la famille SNARE telles que Syntaxin1, Syntaxin2, Syntax3 et VAMP8 sont présentes au niveau du pont intercellulaire et/ou du midbody [383, 387]. La déplétion par siRNA (*small interfering RNA*) de ces protéines conduit à des défauts d'abscission sévères [383, 384, 387, 388].

Une importance des vésicules de sécrétion provenant de l'appareil de Golgi dans l'abscission a été observée [353, 383].

De plus, un rôle majeur des endosomes dans l'abscission a été clairement identifié. Deux types d'endosomes principaux que sont les endosomes de recyclage régulés par Rab11/FIP3 (*rab11 family interacting protein-3*) [384, 389, 390] et les endosomes régulés par Rab35 agissent de concert dans la maturation du pont [361, 391, 392].

La définition d'un second site d'ingression est dépendante des endosomes de recyclage Rab11/FIP3. La fusion des vésicules préférentiellement à ce niveau permet une diminution du diamètre du pont. Même si le signal qui conduit ces vésicules à fusionner de préférence au niveau de ce site n'est pas compris, il a clairement été observé que la déplétion de Rab11 ou de FIP3 inhibait la formation de ce second site d'ingression inhibant ainsi l'abscission [389, 390, 393, 394].

Par ailleurs, les endosomes régulés par Rab11/FIP3 [393] et Rab35 [392, 395] permettent d'inhiber la polymérisation de l'actine et de stimuler sa dépolymérisation dans l'ensemble du pont et au niveau du site d'ingression. Ceci est primordial parce qu'une accumulation d'actine au niveau du pont une fois celui-ci formé conduit à des défauts d'abscission sévères [392]. De plus RHOA doit être désactivée une fois le pont formé car un mutant constitutivement actif de RHOA inhibe l'abscission [396].

FIP3 issu des endosomes de recyclage FIP3/Rab11 interagit avec MgcRacGAP sur le même site que celui impliqué dans l'interaction avec ECT2. Cette interaction a lieu dès la formation du pont intercellulaire. Le recrutement de FIP3 au midbody inhibe ainsi par compétition l'interaction de ECT2 avec MgcRacGAP. ECT2 quitte alors le midbody conduisant à la désactivation de RHOA et une inhibition de la polymérisation de l'actine [394].

De plus, ces endosomes de recyclage apportent la GAP p50RhoGAP (*p50-Rho GTPase-activating protein*) et la protéine SCAMP2/3 (*secretory carrier-associated membrane protein 2/3*) qui ont été identifiées comme jouant un rôle dans la déstabilisation du réseau d'actine particulièrement au niveau du second site d'ingression. L'implication moléculaire de SCAMP2/3 est inconnue mais p50RhoGAP joue sûrement un rôle d'inactivation de RHOA [393].

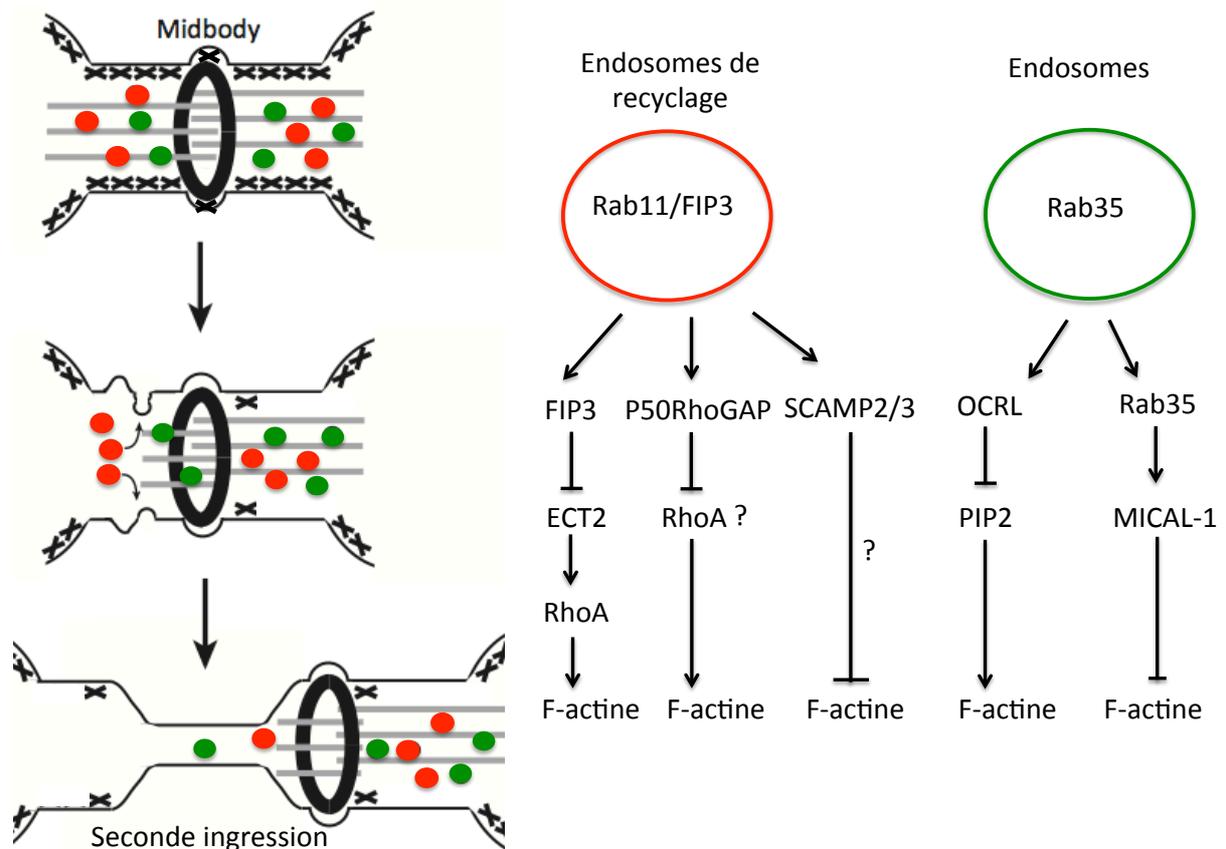


Figure 40 : Inhibition de la polymérisation de l'actine et formation de la seconde ingression par le trafic vésiculaire après la formation et la stabilisation du pont intercellulaire

Inspiré de [379]. (Cf. texte)

Par ailleurs, les endosomes régulés par Rab35 présentent également une fonction déterminante dans la dépolymérisation de l'actine au niveau du pont intercellulaire.

La phosphatase PtdIns(4,5)P₂ 5- phosphatase *Oculocerebrorenal Syndrome of Lowe* (OCRL) interagit avec Rab35 et est apportée au niveau du pont intercellulaire une fois celui-ci formé. Elle permet de déphosphoryler les lipides PIP₂ ce qui conduit en résumé à une déstabilisation ou plutôt à une inhibition de la polymérisation de l'actine au niveau du pont intercellulaire [392].

De plus, une étude récente a permis de mettre en évidence la localisation de MICAL-1 (*molecule interacting with casl protein 1*) au niveau du pont intercellulaire [395]. Cette protéine appartient à la famille des enzymes MICAL qui sont des mono-oxygénases impliquées dans différents processus cellulaires [397]. Dans le cas de MICAL-1, cette enzyme oxyde l'actine filamentaire ce qui modifie les propriétés d'interaction des différents monomères entre eux au sein du filament d'actine conduisant à sa dépolymérisation rapide aux deux extrémités. De façon intéressante, il a pu être observé que cette enzyme était activée

par la GTP-ase Rab35. La déplétion de MICAL-1 conduit à un pont anormal présentant de nombreuses protubérances liées à l'accumulation d'actine au sein du pont entraînant des défauts d'abscission [395].

Ainsi, le trafic vésiculaire est impliqué dans la formation du deuxième site d'ingression et permet de dépolymériser le réseau d'actine à ce niveau permettant aux ESCRT-III de s'y assembler et de pouvoir couper la membrane plasmique. En parallèle, le midbody joue son rôle clé de plateforme de recrutement des ESCRT-III au niveau du site de coupure.

2. Les ESCRTs : assemblage, coupure des microtubules et scission membranaire

Une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes d'abscission a été la découverte de l'implication dans ce processus de la machinerie ESCRT, un complexe spécialisé dans la scission membranaire. La machinerie ESCRT fut découverte au début du siècle comme étant impliquée dans le tri des endosomes vers les lysosomes et la formation des corps multi-vésiculaires (Katzmann et al, 2001). Peu de temps après, il a été établi que la machinerie ESCRT était détournée par différents virus pour le bourgeonnement viral [398-401]. Depuis, une multitude de fonctions leur ont été attribuées telle que leur implication dans l'abscission [402], l'autophagie et plus récemment dans la biogénèse de microvésicules et d'exosomes [403-405], la réparation de la membrane plasmique [406, 407], le renouvellement des pores nucléaires [408, 409] et la scission des dendrites et des axones neuronaux [410-412].

La machinerie ESCRT est composée de 6 groupes différents, ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III, l'enzyme de désassemblage VPS4 et la protéine associée aux ESCRT ALIX (répertoriées dans la figure 41). ESCRT est conservé chez la levure et on retrouve souvent dans la littérature le nom des protéines de levure (figure 41).

La composition des protéines du complexe ESCRT varie selon la fonction dans laquelle il est impliqué. L'activité de scission membranaire est néanmoins toujours assurée par des sous-unités ESCRT-III (CHMPs *charged multivesicular body protein* et IST1

increased sodium tolerance protein 1) bien que leur composition varie également selon la fonction [413, 414]. La machinerie ESCRT s'assemble de façon séquentielle.

L'implication des ESCRT-0 (HRS et STAM) a été montrée uniquement dans la formation des corps multivésiculaires. Durant la formation des corps multivésiculaires, le complexe ESCRT-0 est recruté aux endosomes en interagissant avec l'ubiquitine par trois UBDs portés par STAM (VHS, UIM et SH3) [124, 415] et deux UBDs portés par HRS (VHS, DUIM) et avec les lipides PIP3 de l'endosome par le domaine FYVE de HRS [416, 417]. Ils recrutent alors le complexe ESCRT-I [418] (dont TSG101) qui recrute à son tour le complexe ESCRT-II [158, 419, 420]. ESCRT-II interagit avec CHMP6 qui appartient aux ESCRT-III [421]. CHMP6 recrute alors CHMP4B et les autres sous-unités des ESCRT-III [422, 423]. Néanmoins dans certaines fonctions comme par exemple le bourgeonnement viral, la biosynthèse d'exosomes ou dans la réparation de la membrane plasmique, les ESCRT-II ne sont pas impliquées et les ESCRT-I et /ou ALIX recrutent directement les ESCRT-III [413, 424]. Les ESCRT-III interagissent alors avec la protéine VPS4 [425-427] associée à son cofacteur VtaI [428, 429]. VPS4 appartient à la famille des AAA-ATPases (*atpases associated with diverse cellular activities*) qui convertit l'énergie chimique issue de l'hydrolyse de l'ATP en activité mécanique. Celle-ci permet le désassemblage de l'ensemble de la machinerie permettant le recyclage du complexe [430, 431]. VPS4 joue également un rôle déterminant dans le processus de scission membranaire [414].

| Complex | Yeast protein | Alternative names (yeast) | Metazoan protein | Alternative names (metazoan) | Motifs and domains |
|-----------|---------------|---------------------------|------------------|------------------------------|--|
| ESCRT-I | Vps23 | Stp22 | TSG101 | | UEV, PRD, stalk, headpiece |
| | Vps28 | | VPS28 | | Headpiece, Vps28 CTD |
| | Vps37 | Srn2 | VPS37A, B, C, D | | Basic helix, stalk, headpiece |
| | Mvb12 | | MVB12A, B, UBAP1 | | Stalk, MAPB |
| ESCRT-II | Vps22 | Snf8 | EAP30 | | Basic helix, Winged-helix |
| | Vps25 | | EAP20 | | Winged-helix |
| | Vps36 | | EAP45 | | Winged-helix, GLUE, NZF1 (yeast), NZF2 (yeast) |
| ESCRT-III | Vps2 | Did4 Chm2 | CHMP2A, B | | MIM1 |
| | Vps20 | Chm6 | CHMP6 | | MIM2 |
| | Vps24 | | CHMP3 | | Weak MIM1 |
| | Snf7 | Vps32 | CHMP4A, B, C | Shrub | Weak MIM2 |
| | Vps60 | Chm5 | CHMP5 | | |
| | Did2 | Chm1 Vps46 | CHMP1A, B | | MIM1 |
| | | | CHMP7 | | |
| | Ist1 | | IST1 | | MIM1, MIM2 |
| Vps4-Vta1 | Vps4 | | VPS4A, B | SKD1 | MIT, AAA |
| | Vta1 | | VTA1 | LIP5 | MIT |
| Bro1/ALIX | Bro1 | Vps31 | ALIX | AIP1 | Bro1, V, PRD |

Figure 41 : Tableau récapitulatif des différentes protéines ESCRT et de leurs domaines associés à l'exception des ESCRT-0

Extrait de [413]. Notons la présence d'un grand nombre d'UBDs dans la machinerie ESCRT exceptée pour les ESCRT-III et VPS4 tels que les domaines UEV, Glue, NZFs, V. Les UBDs des ESCRT-0 sont explicités dans le texte. Les ESCRT-III présentent tous des domaines MIM qui sont des domaines d'interaction aux microtubules, mais également aux domaines MIT. Cela permet aux ESCRT-III d'interagir avec VPS4 et Vta1, Spastin qui est une enzyme de coupure des microtubules, ainsi qu'avec les déubiquitines AMSH et UBPY qui présentent des domaines MIT. Uniquement l'implication de ces interactions avec VPS4 et Vta1 et Spastin ont été mises en évidence durant la cytotinèse.

Les ESCRT-III permettent la scission membranaire en formant des polymères hélicoïdaux à l'intérieur de l'objet à couper. Ces protéines sont connues pour s'assembler dans des structures membranaires étroites [380] (0,05 – 0,2 μ M) et pour rapprocher les deux membranes plasmiques qui se font face pour finalement les couper par scission membranaire par un mécanisme toujours inconnu [414]. Les sous-unités ESCRT-III peuvent former des structures hélicoïdales de différentes formes comme par exemple des spirales, des tubes, des

dômes et d'autres formes (figure 42) [432-436]. Les sous-unités ESCRT-III sont capables d'homo-oligomériser ou d'hétéro-oligomériser. Parmi les différentes études visant à caractériser les structures des polymères *in vitro* à partir de la même sous-unité d'ESCRT-III ou à partir de quelques sous-unités différentes, aucune n'a montré de formation de filaments de 17 nm. Ceci suggère qu'ils pourraient être constitués d'un mélange complexe de protéines d'ESCRT-III durant la cytokinèse.

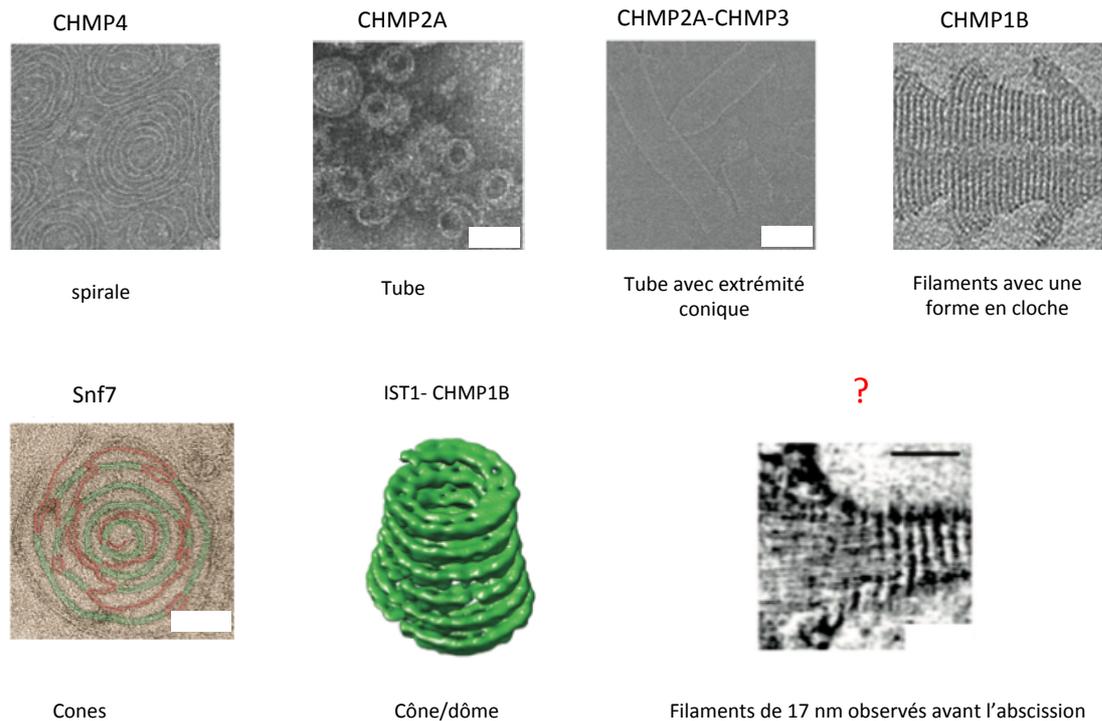


Figure 42 : Les ESCRT-III adoptent différentes formes

Les ESCRT-III forment des homo-oligomères ou hétéro-oligomères hélicoïdaux qui présentent une grande variété de forme. Les ESCRTs responsables de la formation des filaments de 17 nm ne sont pas connus et pourraient être constitués de différentes sous-unités différentes.

Dans un grand nombre de fonctions associées aux ESCRT, l'ubiquitine y joue un rôle crucial mais cela n'a pas été identifié durant la cytokinèse. Un grand nombre de protéines des ESCRT (de ESCRT-0 à ESCRT-II et ALIX) présentent des domaines d'interaction à l'ubiquitine. Notons également que les protéines ESCRT-III présentent un grand nombre de domaines MIM (*MIT interacting motif*) leur permettant d'interagir avec les microtubules et avec les domaines MIT (*microtubule interacting and transport domain*). De façon intéressante, les domaines MIT qui sont constitués d'un faisceau de 3 courtes hélices α sont retrouvés dans la protéine VPS4, la protéine Spastin qui est impliquée dans la coupure des

microtubules et dans les déubiquitinasés AMSH [437, 438] et UBPY (*ubiquitin isopeptidase Y*) [439] dans la formation de corps multivésiculaires. Ces quatre protéines sont présentes au midbody et jouent un rôle dans l'abscission même si dans le cas des déubiquitinasés leur lien avec la machinerie ESCRT n'a pas été identifié [440-442].

Le rôle des ESCRT dans l'abscission est indéniable. Les protéines TSG101, ALIX, les ESCRT-II et les protéines CHMP6, CHMP1 (qui recrute Spastin au midbody), CHMP3, CHMP4B et CHMP4C, CHMP2A et CHMP2B, IST1, VPS4 et Spastin sont présentes au midbody [358, 402, 437, 443-446]. Toutes ces protéines lorsqu'elles sont déplétées par siRNA conduisent à des défauts d'abscission (plus ou moins sévères) [402, 440, 443, 447] [353, 448]. De plus, la présence des filaments de 17 nm au niveau du site de l'abscission est dépendante de CHMP2A et sa déplétion conduit à la disparition de cette structure [353].

Le dernier argument en cette faveur a été l'identification des protéines qui recrutent les ESCRT au midbody. Le recrutement des ESCRT au midbody est séquentiel durant la maturation du pont intercellulaire et les différents complexes ESCRT présentent des localisations précises au sein du pont intercellulaire [358].

CEP55 est l'acteur principal du recrutement des ESCRT au niveau du midbody [358, 402, 443, 444, 447]. Je reviendrai sur cette protéine dans la dernière partie de cette introduction. CEP55 est recrutée au midbody après la formation du pont intercellulaire. Elle se localise au niveau de la « dark-zone » comme cela a été clairement montré par des images de microscopie à super résolution (SIM pour *structured illumination microscopy*) mais également au niveau de la région corticale centrale du midbody où elle est majoritairement présente [358]. CEP55 recrute ensuite au midbody par interaction directe à la fois TSG101 (ESCRT-I) et ALIX [444]. Notons qu'une étude a mis en évidence que la protéine BRCA2 (*breast cancer type 2 susceptibility protein*) était localisée au midbody et qu'elle régulait l'interaction entre CEP55 et ALIX [449]. Néanmoins le rôle de cette protéine dans la cytokinèse est fortement controversé [450]. La localisation de TSG101 a également fait l'objet d'étude de microscopie à super résolution et elle forme des anneaux flanquant CEP55 en étant localisée approximativement dans les zones corticales centrales et périphériques du midbody [358]. ALIX comme CEP55 est localisée dans la partie centrale du midbody [357].

Ces protéines recrutent les ESCRT-III par deux voies différentes (Figure 43). TSG101 passe par la voie de recrutement classique (ESCRT-I-ESCRT-II-CHMP6- autres protéines

appartenant à ESCRT-III), alors que ALIX recrute directement les ESCRT-III en interagissant avec CHMP4B (figure 43) [447].

Je reviendrai sur les interactions entre les protéines ALIX, TSG101 et CEP55 dans la partie III de ce chapitre. Néanmoins, notons d'ores et déjà que les protéines ALIX et TSG101 peuvent interagir directement.

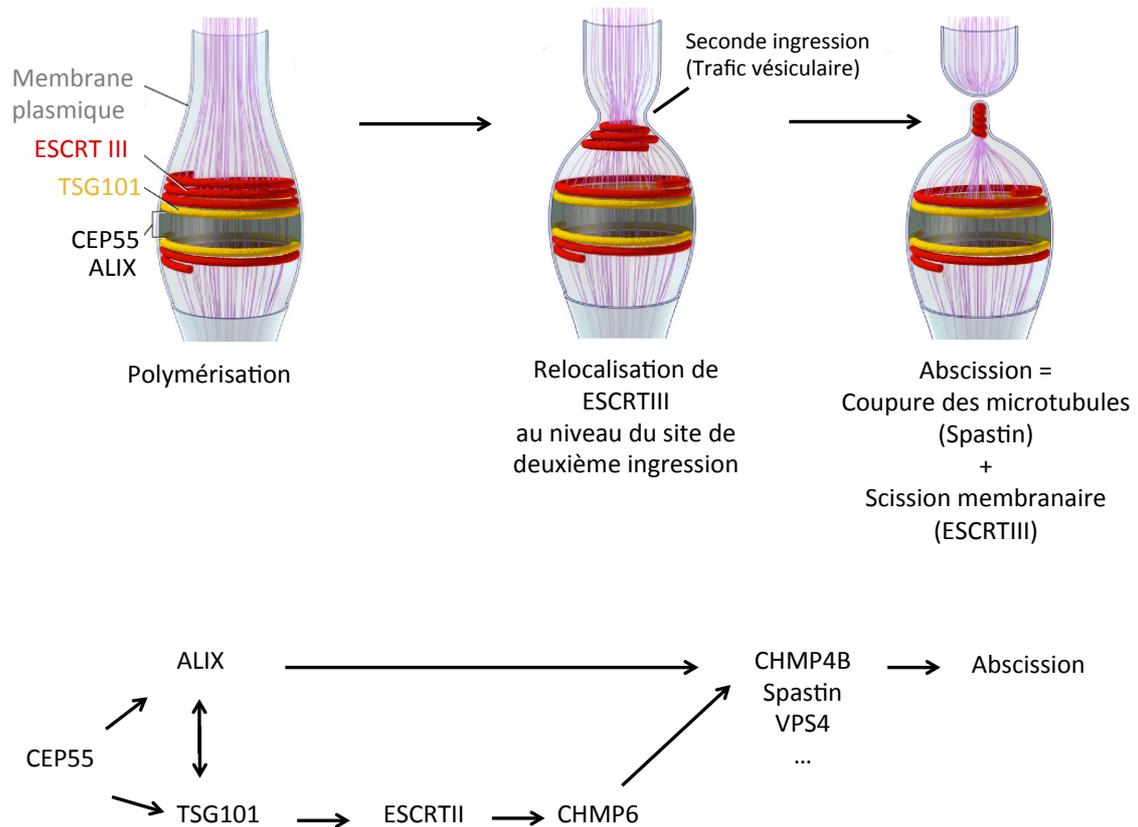


Figure 43 : Schéma représentant l'abscission catalysée par la machinerie ESCRT

Inspiré de [451]. Deux voies de recrutement des ESCRT-III au midbody existent faisant intervenir les protéines TSG101 et ALIX.

De façon étonnante, le site de coupure est localisé à une grande distance du midbody [347, 353]. Il a pu être observé la présence des ESCRT-III comme CHMP4B ou CHMP6 dans la région entre la région corticale périphérique du midbody et la région corticale du pont intercellulaire flanquant celui-ci [358, 448]. Les ESCRT-III et TSG101 forment des anneaux qui entourent le réseau microtubulaire.

Juste avant l'abscission une relocalisation des ESCRT-III est observée au site d'abscission [353, 358]. Différents modèles existent qui sont liés aux différents modèles de scission membranaire des ESCRT-III existants (pour une revue cf. [414]).

Néanmoins, dans le modèle d'abscission actuel, cette relocalisation fait intervenir la formation d'un second site d'ingression permis par le trafic vésiculaire [286, 287, 379]. Finalement les ESCRT-III présents au niveau du second site d'ingression catalysent alors à la fois la coupure des microtubules par Spastin et la fission membranaire permettant l'abscission.

La dichotomie que j'ai faite ici entre les fonctions distinctes du midbody et du trafic vésiculaire dans le processus d'abscission n'existe pas réellement. Ces deux voies sont interconnectées.

Ainsi le midbody régule également le processus de recrutement des vésicules au niveau du pont intercellulaire. Sans entrer dans les détails, notons par exemple que BRUCE une protéine présente au midbody est importante dans la régulation du trafic vésiculaire au midbody [452]. Par ailleurs, le trafic vésiculaire pourrait également jouer un rôle dans le recrutement des ESCRT au niveau du site d'abscission. La protéine SCAMP3 a été montrée comme interagissant avec TSG101 [453]. De plus, il a été observé des endosomes riches en PIP3 qui contiennent la protéine FYVE-CENT (*fyve domain-containing centrosomal protein*) au niveau du pont intercellulaire [454]. Cette protéine forme un complexe avec TTC19 (*tetratricopeptide repeat domain 19*) et ce complexe est capable d'interagir directement avec CHMP4B [454]. L'implication fonctionnelle de ces interactions dans l'abscission restent néanmoins à être confirmée.

Le modèle actuel d'abscission fait ainsi intervenir deux acteurs principaux que sont la machinerie ESCRT et le trafic vésiculaire qui agissent de concert afin de permettre la séparation finale des deux cellules filles.

Cependant, à ce jour, je n'ai trouvé aucune étude qui ait identifié de régulateur de l'abscission qui soit absolument essentiel au processus, c'est-à-dire que l'inactivation de la protéine en question (comme par exemple des protéines du complexe ESCRT-III) ne conduise à un défaut d'abscission total. Les cellules présentent des défauts drastiques d'abscission mais continuent tout de même à se diviser. La grande majorité des études effectuées dans le domaine utilisent des approches de déplétion par siRNA qui pourraient conduire à une efficacité partielle d'extinction des gènes en question pouvant expliquer que les cellules se divisent finalement. Une autre hypothèse supposerait que les mécanismes régulant l'abscission ne soient pas encore totalement compris et que différentes voies agissent en

parallèle. La cellule pourrait activer des mécanismes de compensation afin de permettre la séparation finale des cellules filles lorsqu'une voie est inactivée.

D. Le point de contrôle de l'abscission

Comme un grand nombre de processus importants du cycle cellulaire, l'abscission qui conduit à la séparation irréversible des cellules filles est également soumise à un point de contrôle [455].

Ce point de contrôle appelé « NoCut » et qui fait intervenir la kinase Aurora B a d'abord été découvert chez la levure dans le cadre d'une mauvaise ségrégation des chromosomes durant l'anaphase [456, 457]. Pendant l'anaphase, si la ségrégation des chromatides est incomplète, l'anneau contractile peut comprimer l'ADN non ségrégué formant un pont d'ADN à l'intérieur du pont intercellulaire. La cellule peut alors détecter l'anomalie et retarder le processus d'abscission afin d'éviter une coupure hasardeuse de l'ADN pouvant conduire à des cellules aneuploïdes.

Ce point de contrôle « NoCut » existe également chez l'homme et il fait intervenir la protéine Aurora B au sein du complexe CPC [305, 352]. Dans une cellule normale, la déplétion par siRNA ou l'inactivation chimique d'Aurora B accélère légèrement l'abscission alors que son activation constitutive la retarde légèrement montrant qu'Aurora B jouerait un rôle inhibiteur de l'abscission.

Cette kinase est présente au niveau de la région périphérique du midbody et au niveau du pont intercellulaire flanquant le midbody avant l'abscission. En revanche, lorsqu'un pont d'ADN est détecté, Aurora B au sein du complexe CPC se relocalise au niveau de la région centrale du midbody et un retard élevé d'abscission est détecté. Si Aurora B est inactivée dans des cellules qui présentent un pont d'ADN, le pont se résorbe alors très rapidement conduisant à une cellule binucléée tétraploïde.

Ceci suggère deux choses. Premièrement Aurora B est impliquée dans l'inhibition du processus d'abscission dans des cellules ayant un pont d'ADN. Deuxièmement, que le pont d'ADN déstabilise le pont intercellulaire et qu'Aurora B permet de le stabiliser afin d'empêcher sa résorption (figure 44).

Borealin qui appartient au complexe CPC interagit directement avec CHMP4C [446, 458]. Contrairement à ses isoformes CHMP4B et CHMP4A, CHMP4C présente une séquence supplémentaire qui est reconnue et phosphorylée par Aurora B reliant ainsi la machinerie ESCRT-III à « NoCut ». A la différence des autres ESCRT-III, CHMP4C, qui est également recrutée au midbody, joue un rôle inhibiteur de l'abscission. De plus, la déplétion de CHMP4C dans des cellules qui contiennent un pont d'ADN inhibe le retard d'abscission induit par Aurora B. Une résorption du pont peut être également observée mais à un degré moindre comparé à celui mis en évidence suite à la déplétion d'Aurora B (figure 44).

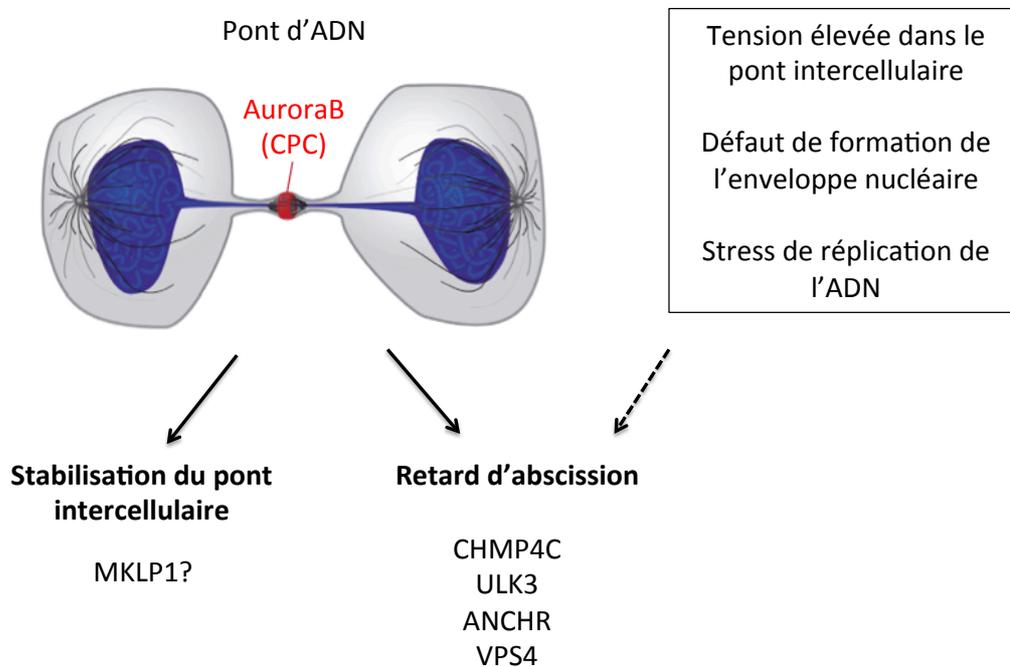


Figure 44 : Le point de contrôle « NoCut »

Inspiré de [286]. La présence d'un pont d'ADN dans le pont intercellulaire conduit à une activation de « NoCut » caractérisée par une relocalisation d'Aurora B au sein du complexe CPC au niveau de la partie centrale du midbody. « NoCut » permet alors à la fois de stabiliser le pont intercellulaire et de retarder longuement l'abscission. Lorsque « NoCut » est activé par les autres signaux décrits, Aurora B est également recrutée dans la partie centrale du midbody et conduit à des retards d'abscission variables en fonction du signal mais le phénomène de stabilisation du pont n'a pas été décrit.

Une étude récente a mis en évidence que ANCHR (*abscission/nocut checkpoint regulator*) était localisée au midbody et qu'elle ne jouait un rôle que dans les cellules qui présentaient un pont d'ADN [440]. La déplétion de cette protéine dans ces cellules conduit souvent à la résorption du pont intercellulaire. ANCHR interagit par son domaine MIM au

domaine MIT de VPS4 et cette interaction est essentielle pour sa fonction. Il a été montré que ANCHR et CHMP4C formeraient probablement un complexe ternaire avec VPS4 conduisant à une inhibition de cette dernière et ainsi à un retard d'abscission (figure 44).

Par ailleurs, la kinase ULK3 (*unc-51 like kinase 3*) phénocopie CHMP4C lorsqu'elle est déplétée dans des cellules normales ou des cellules qui présentent un pont d'ADN [459]. ULK3 se localise au midbody et présente un domaine MIT lui permettant d'interagir avec différentes sous-unités ESCRT-III qu'elle phosphoryle dont IST1. Des mutants phosphomimétiques de IST1 induisent un gain d'interaction de la protéine pour VPS4. Parce qu'ULK3 phosphoryle également la protéine CHMP4C au niveau de son domaine MIM, il a été proposé que ULK3 pourrait réguler positivement l'interaction entre VPS4 et CHMP4C afin d'inhiber l'abscission (figure 44).

Ainsi les différents acteurs moléculaires de « NoCut » connus pour l'instant sont Aurora B, CHMP4C, ULK3 et ANCHR. Ces 4 protéines semblent être impliquées dans la même voie pour inhiber la formation des ESCRT-III en inhibant VPS4 (figure 44). Par ailleurs la protéine ALIX a également été décrite récemment comme pouvant jouer un rôle dans « NoCut » qui sera explicité dans la dernière partie de cette introduction.

De plus, nous avons vu précédemment qu'Aurora B permettait également de stabiliser le pont intercellulaire de façon concomitante à son rôle inhibiteur de l'abscission. Les protéines impliquées ne sont cependant pas connues. La phosphorylation de MKLP1 par Aurora B au niveau du pont intercellulaire a d'abord été considérée comme étant le processus majeur de stabilisation du pont. Cependant, cette phosphorylation a lieu également dans le cas de cytokinèse sans la présence de pont d'ADN remettant en cause cette hypothèse.

De façon intéressante, différentes études montrent que le check-point « NoCut » ne serait pas uniquement activé dans le cas de ponts d'ADN. Néanmoins, il n'a pas été montré de stabilisation du pont intercellulaire lorsque « NoCut » était activée par ces autres signaux (figure 44).

Ainsi, une étude a révélé que des cellules qui se divisaient à faible confluence présentaient un retard d'abscission comparées à des cellules qui se divisaient à forte confluence [459, 460]. A faible confluence, une plus forte tension est exercée par les deux

cellules filles sur le pont intercellulaire. De façon contre-intuitive, plus les cellules filles exercent une forte tension sur le pont cellulaire et moins elles se séparent rapidement ce qui est dû à un assemblage des ESCRT-III retardé de façon dépendante de « NoCut » [459, 460].

En télophase, l'enveloppe nucléaire des noyaux des futures cellules filles se reforme. De façon surprenante, dans le cas de défauts d'assemblage des pores nucléaires, un retard d'abscission dû également à l'activation de « NoCut » est observé. [440, 446, 459, 461].

Enfin, le point de contrôle « NoCut » est également activé dans le cas de stress de réplication de l'ADN [462]. Ces lésions peuvent notamment être réparées durant la phase G1 du cycle suivant la phase S de la cellule durant laquelle les lésions de l'ADN sont apparues [462]. Ces cellules en G1, qui sont encore séparées par un pont intercellulaire, présentent un retard impressionnant d'abscission [463].

E. Les midbody post-abscission

Comme nous l'avons vu, l'abscission qui a lieu à environ $1 \mu\text{M}$ du midbody libère les deux cellules filles. Une des cellules hérite alors de façon asymétrique du midbody qui est intact. On parle alors de midbody remnant (MR) qui sera alors dégradé dans la cellule [345, 347, 464-467].

Deux modèles existent décrivant la façon dont le MR est hérité qui dépendent du nombre de sites de coupures du pont intercellulaire [467].

Dans le premier cas, qui est minoritaire, un site de coupure est généré. Le MR est alors hérité par un phénomène de rétraction membranaire. Le MR se retrouve ainsi dans le cytoplasme d'une des cellules filles [466, 468, 469].

Dans la seconde situation qui est majoritaire [345, 467], le premier site de coupure est rapidement suivi d'un deuxième site de coupure de l'autre côté du midbody (environ 10 min). Notons que l'assemblage des ESCRT-III au niveau du deuxième site de coupure intervient très rapidement après la première coupure, ce qui est en accord avec les résultats qui montrent qu'une diminution de la tension dans le pont accélère drastiquement leur assemblage au niveau du site d'abscission [459, 460]. Le MR est alors libéré dans le milieu extracellulaire [466, 467]. A la différence du premier scénario, le MR est également entouré de la membrane plasmique de la partie centrale du pont intercellulaire. Ce MR « s'accroche » alors à la membrane plasmique d'une des cellules filles pendant plusieurs heures et il est internalisé par

un mécanisme proche de la phagocytose qui est dépendant de l'actine. Des images de microscopie électronique à balayage montrent des protrusions de la membrane plasmique avant l'absorption du MR [467]. Il a également été observé que ce MR était capable de diffuser à plus longue distance dans le milieu extracellulaire et de « s'accrocher » à la membrane d'une autre cellule que les cellules filles et d'être internalisé par ce même mécanisme [467].

Dans le premier cas, le midbody est dégradé par autophagie [466, 468, 469] alors que dans le second cas le midbody est dégradé par dégradation lysosomale vésiculaire [467]. Ainsi le midbody soit au sein d'un autophagosome soit au sein d'une vésicule endosomale fusionne finalement à un lysosome dans lequel il est dégradé.

L'autophagie constitue la 2^{ème} grande voie de dégradation protéique faisant intervenir l'ubiquitine et préférentiellement des chaînes de poly-ubiquitine K63. Yoshinori Oshumi a reçu le prix Nobel de Physiologie ou de Médecine en 2016 pour ses recherches sur la compréhension des mécanismes moléculaires de ce processus. L'autophagie fait intervenir des récepteurs de l'autophagie. Ces protéines comme par exemple OPTINEURIN, p62/SQSTM1 (*ubiquitin-binding protein p62-sequestosome-1*) ou NBR1 (*neighbor of brca1 gene 1 protein*) présentent un ou des domaines d'interaction à l'ubiquitine leur permettant de reconnaître l'entité à dégrader qui est fortement ubiquitiné. Elles présentent également un domaine LIR (*LC3-interacting region*), qui leur permet de recruter la protéine LC3/Atg8 (*microtubule-associated protein 1a/1b-light chain 3/autophagy-related protein 8*) qui, elle, est impliquée dans la formation de la membrane de l'autophagosome.

Le nombre de MR, la capacité des cellules à accumuler ces MR, ainsi que l'utilisation d'une voie de dégradation plutôt qu'une autre varient fortement en fonction du type cellulaire [466, 467].

L'implication fonctionnelle de la présence du MR dans une cellule n'est pas connue. Il a été proposé que le MR puisse jouer un rôle de messager intercellulaire ou qu'il pourrait être impliqué dans la différenciation ou la polarité des cellules *in vivo*.

Néanmoins, les observations actuelles sont uniquement corrélatives et il a été observé par exemple que les cellules cancéreuses accumulaient plus de midbody que des cellules saines [469]. Les cellules fortement différenciées présentent également moins de MR que des cellules pluripotentes [469].

L'idée séduisante que le processus de cytokinèse permettrait à la fois la séparation des cellules filles mais régulerait également, après l'abscission, les cellules filles elles-mêmes ou les cellules environnantes au sein d'un tissu via le MR nécessite des études supplémentaires.

F. L'ubiquitine et le pont intercellulaire

Peu d'études publiées portent sur le rôle de l'ubiquitine et sa localisation au niveau du pont intercellulaire [442, 452]. Elles ont tout de même permis d'identifier une accumulation d'ubiquitine au niveau du pont intercellulaire et du midbody.

L'ubiquitine est hautement dynamique au niveau du pont intercellulaire [452] (figure 45A). Cela a pu être mis en évidence par l'utilisation, en condition de surexpression, d'ubiquitine fusionnée à de la GFP capable d'être conjuguée *in vitro* (sauf les chaînes M1). Il a été observé que dans les phases précoces de maturation du pont intercellulaire, l'ubiquitine s'accumulait dans la région flanquant le midbody (contenant la région périphérique du midbody) en deux points très intenses. Le marquage de l'ubiquitine disparaît ensuite pendant environ 15 à 30 minutes pour s'accumuler au niveau de la partie centrale du midbody jusqu'à l'abscission.

De façon intéressante, il semble que les types d'ubiquitine ne soient pas exactement les mêmes dans la région flanquant le midbody et dans région centrale. En effet, la localisation de l'ubiquitine au niveau de la partie centrale du midbody est faiblement altérée par l'utilisation d'ubiquitine GFP-Ub K0, dans laquelle toutes les lysines de l'ubiquitine sont modifiées et qui ne peuvent donc pas former de chaînes d'ubiquitine. Cependant elle est fortement altérée pour l'ubiquitine localisée au niveau de la région flanquant le midbody. Cela suggère que la région flanquant le midbody est plutôt constituée de chaînes d'ubiquitine alors que la partie centrale est principalement constituée de mono-ubiquitinations [452].

La localisation changeante de l'ubiquitine au niveau du pont intercellulaire a été confirmée par immuno-marquage de l'ubiquitine endogène sur cellules fixées [442, 452]. Le rôle de ces changements de localisation de l'ubiquitine durant le processus de maturation du pont n'est pas compris.

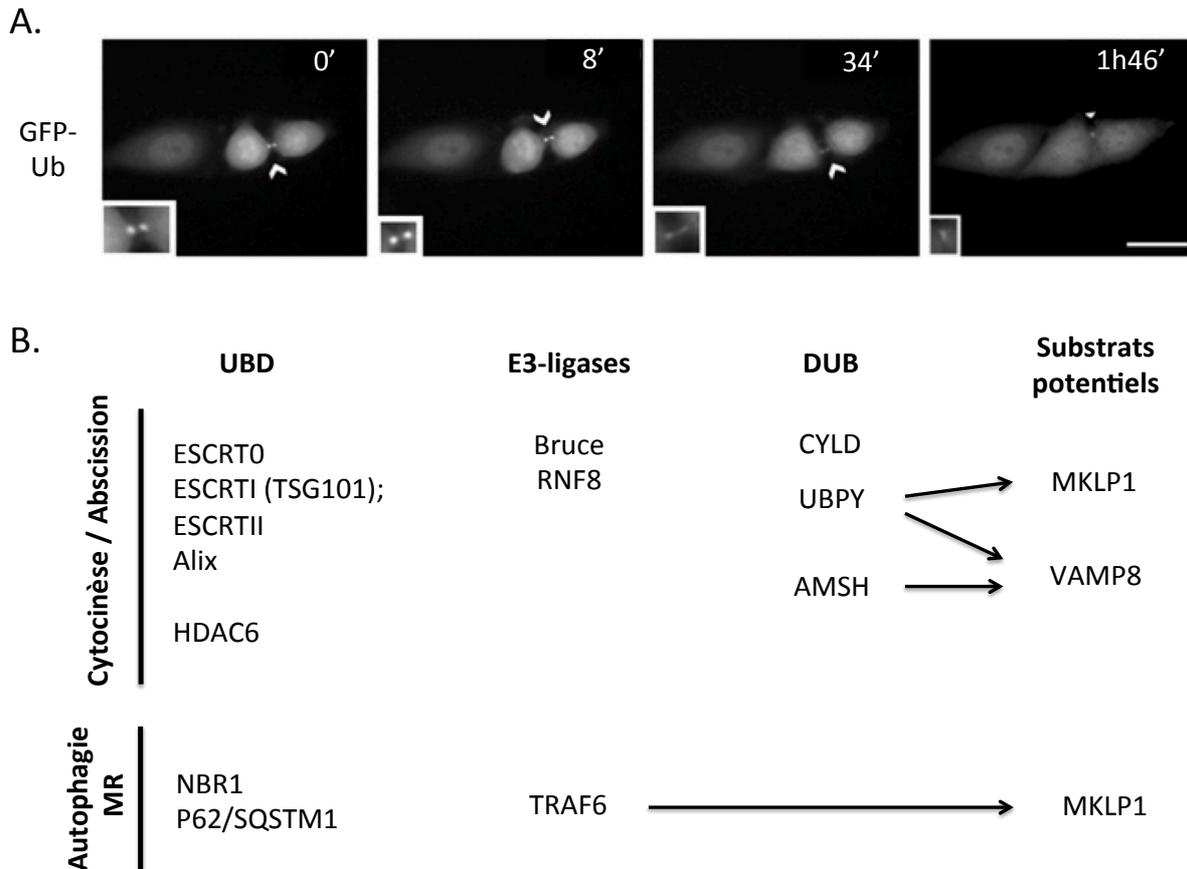


Figure 45 : Le pont intercellulaire et l'ubiquitine

A. La localisation de l'ubiquitine au niveau du pont intercellulaire varie durant le processus de maturation. **B.** Vue d'ensemble des différentes protéines du système de l'ubiquitine présentes au niveau du pont intercellulaire.

Il a été également observé l'implication d'enzymes de synthèse de l'ubiquitine dans les phases tardives de la cytokinèse (résumés dans la figure 45 B).

L'E2/E3 ligase BRUCE (*bir repeat-containing ubiquitin-conjugating enzyme*) y présente un rôle crucial et sa déplétion conduit à des défauts de structuration du pont et du midbody couplés à des défauts d'abscission et à l'apoptose massive des cellules [452]. Cette enzyme qui n'est pas très bien caractérisée est notamment connue pour modifier ses substrats par mono-ubiquitination [452, 470]. Cette enzyme joue un rôle important dans la localisation de l'ubiquitine au pont intercellulaire même si son activité E2/E3 n'est peut être pas déterminante dans ce procédé [452]. Cette E2/E3 ligase présente une localisation pericentriolaire pendant la prophase, se relocalise massivement au niveau du fuseau central pendant l'anaphase et est finalement présente au niveau de la partie centrale du midbody jusqu'à l'abscission. Il a été montré que le recrutement de BRUCE au midbody était dépendant de MKLP1 puisque la déplétion de cette dernière conduit à un défaut drastique de

localisation de BRUCE au midbody. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation montrent une interaction (directe ou indirecte) entre les deux protéines [452]. Par ailleurs, il a été observé que cette protéine était associée au trafic vésiculaire et particulièrement avec les endosomes de recyclage régulés par Rab11 et que sa localisation au midbody était essentielle au routage de ces vésicules au niveau du pont intercellulaire [452].

De plus l'E3 ligase RNF8 (*ring finger protein 8*) a été montrée comme étant localisée également au niveau de la région centrale du midbody mais présente également une fonction dans les phases précoces de la cytoténèse en régulant SEPT7 [471, 472]. Cette E3 ligase joue un rôle crucial dans la réparation de l'ADN suite à une coupure double brin. Elle modifie les histones H2A et H2B dans le cas de lésions de l'ADN double brin par ajout de chaînes de poly-ubiquitine K63 permettant le recrutement de protéines de réparation qui contiennent en grande partie des UBDs de type UBZ [473, 474]. En parallèle, elle ubiquitine par des chaînes K48, les protéines « gênantes » présentes au niveau du site de lésion pour laisser la place aux protéines de réparation de l'ADN. Lorsque RNF8 est surexprimée, cela conduit également à des défauts d'abscission. Ces défauts sont atténués lorsqu'un mutant catalytique est surexprimé montrant que son activité enzymatique d'E3-ligase est impliquée [472].

Enfin, l'E3 ligase TRAF6, qui est très sélective des chaînes K63, est présente au niveau de la région centrale du midbody en fin de processus de maturation du pont intercellulaire [475]. Son rôle dans la régulation de l'abscission n'a pas été montré mais l'activité E3-ligase de TRAF6 est importante dans la dégradation des midbody remnant (MR) [475]. En effet, la déplétion de cette E3 conduit à une accumulation de MR dans le cytoplasme qui est restauré par l'expression de TRAF6 WT mais pas par un mutant de TRAF6 catalytiquement inactive. De plus, les auteurs ont observé que TRAF6 ubiquitinait MKLP1 *in vitro* et *in cellula*. Les auteurs ont effectué différentes expériences dans un contexte cellulaire pour vérifier l'ubiquitination de MKLP1 par TRAF6 [475]. L'interprétation des résultats montrant une ubiquitination de MKLP1 dans les cellules est néanmoins discutable.

La forte dynamique de l'ubiquitine au pont intercellulaire suggère que certaines déubiquitinases pourraient y jouer un rôle important.

CYLD a été montrée comme étant localisée dans la région centrale du midbody [476, 477] et est capable d'interagir avec les microtubules. Cette déubiquitinase est connue pour désassembler sélectivement des chaînes K63 et M1 dans la voie NF- κ B. Son rôle dans l'abscission n'est pas très clair. Néanmoins il a été mis en évidence qu'elle interagissait (de

façon directe ou indirecte) avec l'histone déacétylase HDAC6 présente également au niveau du midbody qui possède un UBD de type UBP. Il a été observé que CYLD, de façon indépendante de son activité enzymatique, régule la stabilité des microtubules avec HDAC6 au niveau du pont intercellulaire. Une déplétion de cette DUB conduit à des défauts d'abscission [476].

Deux études révèlent un rôle déterminant de la DUB UBPY (USP8) dans les phases tardives de la cytokinèse [442, 452]. Cette DUB est capable de déubiquitiner des chaînes K63 comme elle le fait lorsqu'elle est associée aux ESCRT dans la régulation de la formation des corps multivésiculaires. Elle est également capable d'hydrolyser des chaînes K48 dans cette même voie [478] et des chaînes K6 de la protéine PARKIN dans la mitophagie [230]. Cette enzyme est présente au niveau de la région flanquant le midbody (contenant la périphérie du midbody) pendant la formation du pont intercellulaire et au niveau de la région centrale du midbody en fin de processus de maturation du pont intercellulaire [442, 452]. La déplétion et la surexpression d'un mutant dominant négatif catalytiquement inactif d'UBPY (C/A) conduisent à des défauts d'abscission [442]. Par ailleurs, cette enzyme pourrait être directement liée à la déubiquitination de MKLP1 [452]. Les auteurs se sont placés dans des conditions particulières pour observer l'ubiquitination de MKLP1. Après avoir surexprimé de l'ubiquitine fusionnée à une étiquette poly-histidine (Ub^{His}), les extraits cellulaires ont été dénaturés par de l'urée 6 M puis enrichis en protéines modifiées par incubation avec des billes Ni-NTa. Ils ont ainsi pu révéler la présence de formes ubiquitinées de MKLP1 [452]. La présence de ces formes modifiées de MKLP1 ne semble pas dépendre de BRUCE. Cependant, la surexpression du mutant d'UBPY (C/A) dans ces conditions conduit à une augmentation de ces modifications sur MKLP1 montrant que cette enzyme pourrait déubiquitiner MKLP1 [452]. De plus, une autre étude montre qu'UBPY serait lié au trafic vésiculaire en déubiquitinant VAMP8, qui appartient à la famille v-SNARE cruciale dans la fusion vésiculaire et à l'abscission [442]. Cette étude a mis en évidence la présence d'une forme ubiquitinée de VAMP8 par une à trois molécules d'ubiquitines même si l'implication fonctionnelle de cette modification dans la cytokinèse n'a pas été montrée [442]. La déplétion par siRNA de UBPY ou la surexpression d'un mutant catalytiquement inactif conduit à l'augmentation de la modification [442].

Cette étude a également mis en évidence qu'AMSH est localisée au midbody et présente une localisation centrale au sein du midbody [442]. Cette DUB qui est connue pour présenter une très forte sélectivité pour les chaînes d'ubiquitine K63 semble également être importante à l'abscission car une déplétion de cette protéine par siRNA conduit à des défauts

d'abscission [442]. De la même façon qu'UBPY, une déplétion d'AMSH par siRNA ou l'expression d'un mutant dominant négatif AMSH (C/A), conduit à une augmentation de l'ubiquitination de VAMP8 suggérant que ces deux enzymes régulent le niveau d'ubiquitination de cette protéine [442].

Outre la localisation d'E3 et de DUB au niveau du pont intercellulaire, de nombreuses protéines étant présentes au niveau du pont intercellulaire possèdent des UBDs tels que les ESCRT et HDAC6 (*histone deacetylase 6*). Une autre source de domaines UBDs provient des récepteurs de l'autophagie. De façon intéressante, il a pu être observé un recrutement des récepteurs de l'autophagie tels que p62/SQSTM1 et NBR1 ainsi que la protéine LC3/Atg8 au niveau du midbody avant l'abscission [468, 469]. Ce recrutement se fait dans les phases tardives de maturation du pont intercellulaire. Ces protéines sont présentes au niveau de la partie centrale du midbody. Comme pour TRAF6, ces protéines ne semblent pas être importantes dans le processus d'abscission mais ces protéines jouent un rôle déterminant dans la dégradation des MR par autophagie [468, 469].

Par ailleurs, les ESCRT ont également été décrits comme ayant un rôle dans l'autophagie qui n'a pas été mis en évidence au midbody ou au niveau du MR. De façon générale, un rôle de l'autophagie dans le processus de maturation du pont intercellulaire ou dans l'abscission en lui-même n'a pas été découvert. Il a été montré qu'elle jouait un rôle dans la régulation de la phase précoce de cytokinèse en modulant l'expression de la protéine RHOA en anaphase [479, 480].

Ainsi, un rôle de l'ubiquitine dans la dégradation des « midbody remnant » a été mis en évidence.

Néanmoins, il est étonnant qu'aucun rôle précis de l'ubiquitine ou qu'un domaine récepteur à l'ubiquitine impliqué dans l'abscission n'ait été identifié. En effet, tous les éléments semblent pourtant être réunis pour prédire un rôle important de l'ubiquitine dans ce processus (figure 45). Une accumulation impressionnante de celle-ci est observée au niveau du pont intercellulaire ; des enzymes de synthèse et des DUBs sont localisées au pont intercellulaire et sont indispensables à l'abscission et à la stabilité du pont ; tous les complexes ESCRT à l'exception des ESCRT-III présentent des UBDs ; des substrats importants du midbody (MKLP1) et du trafic vésiculaire (VAMP8) sont probablement ubiquitinés ; les ESCRT-III présentent un domaine MIM capable d'interagir avec les

domaines MIT des DUBs AMSH et UBPY et cette interaction est importante dans la fonction des ESCRTs dans la formation des corps multivésiculaires qui est dépendante de l'ubiquitine.

La nature du type de chaînes d'ubiquitine présente au niveau du midbody n'est pas bien caractérisée et pourrait permettre de mieux comprendre le rôle joué par l'ubiquitine durant l'abscission. La difficulté provient du fait que la densité d'ubiquitine est extrêmement élevée durant la formation du pont intercellulaire. Ainsi l'interprétation d'un marquage spécifique par l'utilisation d'un anticorps qui se lie préférentiellement à un type de chaîne d'ubiquitine peut être artéfactuel. En effet, trois types d'anticorps présentant une certaine sélectivité *in vitro* pour les chaînes K63, K48 ou K11 marquent tous les trois fortement le pont intercellulaire au niveau de la région flanquant le midbody [99, 442]. Même si ces résultats doivent être interprétés avec précaution, il est cependant probable qu'il y ait différents types d'ubiquitine au niveau du pont. La sélectivité des enzymes détectées au niveau du pont va en effet dans ce sens.

Le complexe ESCRT-0 constitué des protéines HRS et STAM qui présentent des UBDs permettent le recrutement de toute la machinerie ESCRT dans la régulation de la formation des corps multivésiculaires. Durant la cytokinèse, une autre protéine, CEP55 joue cette fonction cruciale de recrutement de la machinerie ESCRT.

III) La protéine CEP55

A. CEP55, une protéine indispensable au processus d'abscission

1. Généralités sur CEP55 et son recrutement au midbody

CEP55, pour Centrosomal Protein 55 KDa connue aussi sous les noms de c10orf3 et FLJ10540, a été découverte en 2005 [481]. Cette protéine de 464 acides aminés a initialement été décrite comme ayant une localisation centrosomale pendant l'interphase et se dissocierait des centrosomes en début de prophase [481]. CEP55 est ensuite recrutée au midbody juste après la formation du pont intercellulaire [482] et est présente après l'abscission au niveau des midbody remnant [466, 467].

CEP55 est prédite comme étant une protéine majoritairement structurée en coiled-coil dimérique allongée présentant dans sa partie C-terminale une région flexible qui est riche en proline [481]. Les longs coiled-coil CC1 et CC2 sont séparés par une région initialement prédite comme étant une région charnière flexible entre les domaines CC1 et CC2 qui a ensuite été appelée EABR (ESCRT and ALIX binding region) (figure 46A).

Le recrutement de CEP55 au midbody est dépendant de la protéine MKLP1 [356, 482]. Les deux protéines co-localisent au niveau de la région centrale du midbody (figure 46B) [356, 358, 482] et la déplétion de MKLP1 conduit à un défaut de recrutement de CEP55 dans cette région. Par ailleurs, des expériences de co-immunoprécipitation après transcription/traduction *in vitro* des deux protéines dans des réticulocytes a révélé une interaction (directe ou indirecte) entre CEP55 et MKLP1 [356]. La co-immunoprécipitation des deux protéines a été confirmée avec les protéines endogènes dans des cellules HeLa [482]. La formation de ce complexe est dépendante des résidus 230-464 de CEP55 [356].

Une étude récente a révélé qu'un mutant de la protéine CEP55 dans laquelle les 40 résidus C-terminaux sont délétés présente un défaut de recrutement au midbody montrant que cette partie est nécessaire au recrutement de CEP55 au midbody [483].

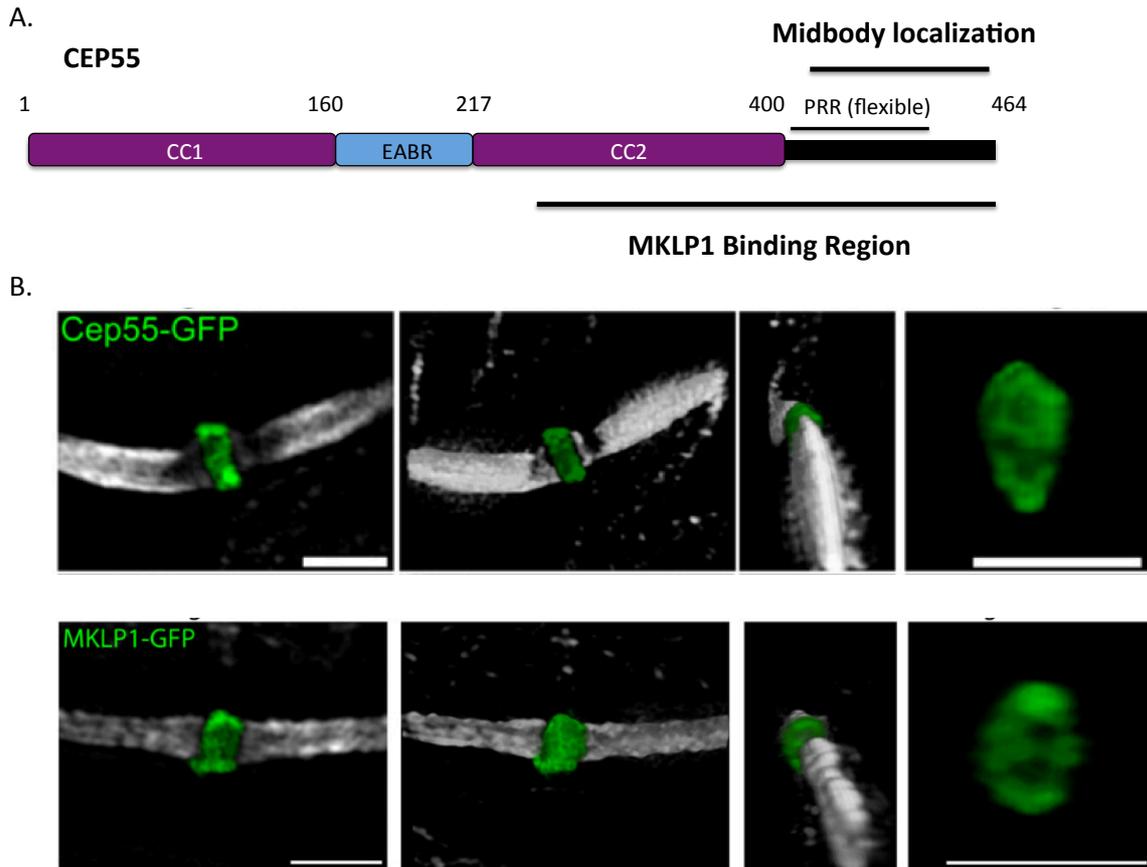


Figure 46 : Domaines fonctionnels et localisation de CEP55 au midbody

A. CEP55 est constituée de deux longs domaines prédits comme étant structurés en coiled-coil séparés par EABR. La partie C-terminale de CEP55 est constituée d'une région flexible riche en proline. Les résidus 230-464 sont impliqués dans l'interaction (directe ou indirecte) avec MKLP1. Une étude récente a montré que les 40 acides aminés C-terminaux de CEP55 sont nécessaires à son recrutement au midbody. **B.** Extrait de [358]. Images de microscopie à super résolution (SIM) de GFP-CEP55 et GFP-MKLP1 montrant que les deux protéines colocalisent dans la région centrale du midbody.

2. Interactions CEP55/ALIX /TSG101 et oligomérisation au midbody

Comme décrit précédemment, CEP55 recrute la machinerie ESCRT au midbody en interagissant directement avec ALIX et TSG101 au niveau de la région charnière EABR. La structure cristallographique de EABR en interaction avec un fragment de la protéine ALIX a été résolue à 2 Å [444].

Elle révèle que cette région est structurée en coiled-coil dimérique présentant une répétition de 6 héptades. Le coiled-coil dans EABR est atypique dans le sens où certains résidus chargés ou des tryptophanes qui sont stériquement encombrants sont présents aux positions a, d, a' et d' créant une asymétrie locale. De façon intéressante, les deux héptades

aux extrémités N et C-terminales présentent des contacts classiques allant dans le sens des prédictions de coiled-coil des CC1 et CC2.

L'asymétrie du coiled-coil dans EABR génère un seul site d'interaction à ALIX et la stoechiométrie du complexe CEP55/ALIX est ainsi de 2:1 respectivement (figure 47). Les protéines ALIX et TSG101 interagissent avec EABR par une séquence conservée GPPX₃Y au sein de leurs régions riches en proline [357, 402, 443, 444] qui est intrinsèquement désordonnée et ces deux protéines entrent en compétition pour le même site dans EABR *in vitro*. Les résidus les plus importants dans l'interaction sont les deux résidus proline et la tyrosine au sein du motif GPPX₃Y qui font des interactions de « stacking » avec deux tyrosines de CEP55 et une liaison hydrogène forte avec un résidu glutamate de CEP55 [444]. De plus, les deux prolines effectuent également des contacts hydrophobes avec un tryptophane de CEP55 [444].

La mutation des résidus importants dans la stabilisation du complexe induit une forte perte d'interaction *in vitro* et altère le recrutement d'ALIX et TSG101 au midbody sans modifier le recrutement de CEP55 dans cette zone. La quantification de ces défauts de recrutement d'ALIX et TSG101 n'a pas été entreprise, mais ils semblent drastiques [444].

Ceci montre que différents homo-dimères de CEP55 sont impliqués pour permettre le recrutement à la fois d'ALIX et de TSG101 au midbody en interagissant directement avec ces protéines.

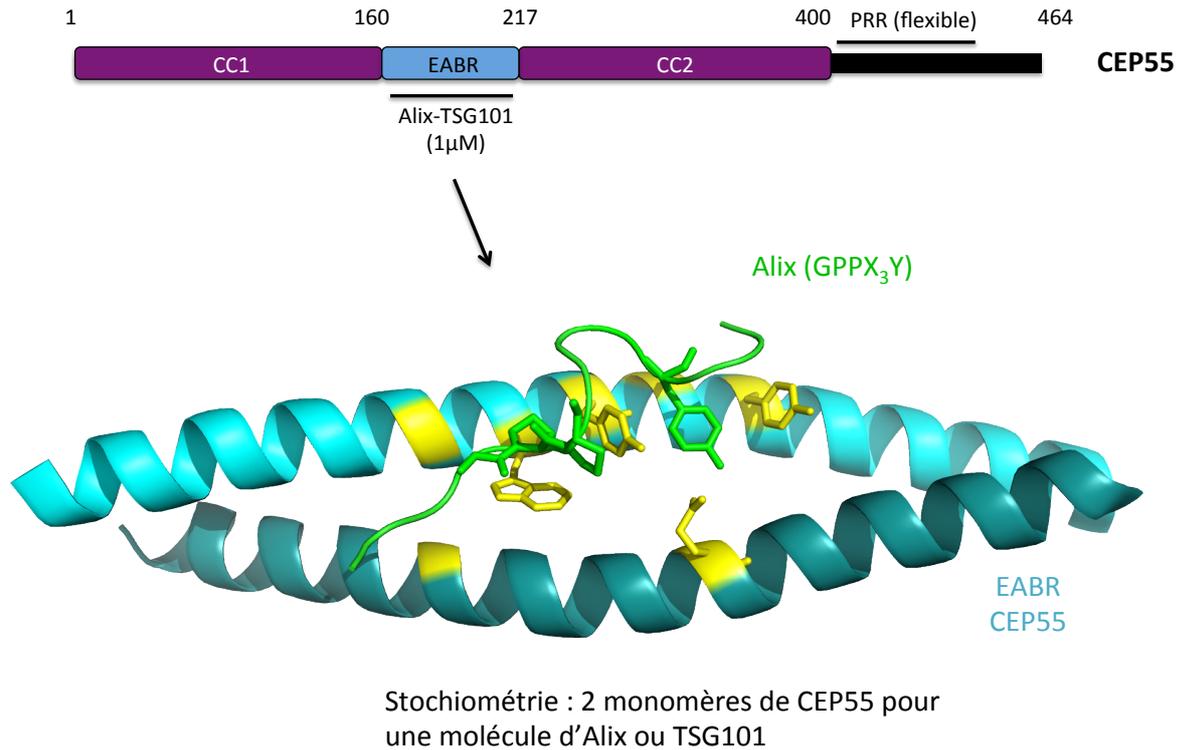


Figure 47 : Interaction entre CEP55 et ALIX/TSG101

La résolution de la structure cristalline de EABR en interaction avec un peptide comportant la séquence GPPX3Y révèle que cette région est structurée en coiled-coil dimérique (PDB : 3E1R). La partie centrale présente une asymétrie créant un seul site de fixation à ALIX ou à TSG101. En jaune sont représentés les résidus impliqués dans la stabilisation du complexe et en bâton sont représentés les résidus les plus importants dans la formation du complexe EABR/ALIX.

De façon générale, de nombreuses observations suggèrent que CEP55 formerait des multimères d'ordre supérieur au midbody.

Premièrement, comme nous venons de le voir, CEP55 recrute à la fois les protéines TSG101 et ALIX au midbody et chaque homo-dimère se lie soit à une molécule d'ALIX soit à une molécule de TSG101 suggérant une forte densité d'homo-dimère de CEP55 dans la région centrale du midbody.

Deuxièmement, le complexe Centralspindlin qui recrute CEP55 dans la région centrale du midbody forme lui-même des oligomères d'ordre supérieur constitué de différents hétérotétramères MKLP1/MgcRacGAP.

Troisièmement, les observations de microscopie à super résolution montrent une organisation de CEP55 circulaire très dense dans toute la région centrale du midbody suggérant la présence de multimères organisés de CEP55 au niveau du midbody [358].

De plus, différentes études montrent par des approches biochimiques [356, 484] que CEP55 est capable d'interagir avec elle-même et notamment par sa partie N-terminale (résidus 1-229). Des expériences de double hybride ont confirmé que les résidus 19-385 de CEP55 sont capables d'oligomériser [443].

Enfin, une tendance de cette protéine à former des multimères/aggrégats a été observée lorsqu'elle est exprimée de façon ectopique dans des cellules eucaryotes ou chez *E.Coli* suggérant qu'elle possède des propriétés intrinsèques à multimériser [402, 444, 469].

Par ailleurs, différentes études montrent qu'ALIX pourrait former une structure multimérique. Il a été observé que ALIX et TSG101 interagissaient directement et que la capacité d'ALIX à former des formes multimériques et/ou sa capacité à interagir avec TSG101 contribuaient à la fonction de ces protéines dans l'abscission.

Tout d'abord l'interaction directe entre ALIX et TSG101 a été mise en évidence [485]. Cette interaction fait intervenir le domaine UBD de TSG101 qui reconnaît une séquence PSAP présente dans la région PRR C-terminale de ALIX (Figure 48). Ces domaines purifiés et isolés interagissent avec une affinité faible de 130 μM *in vitro*. Comme décrit précédemment, la machinerie ESCRT est détournée par de nombreux virus qui l'utilisent pour le bourgeonnement viral. Des protéines de différents virus comme HIV-1, HTLV-1 (PDB : 4ZNY), EBOLA interagissent par une séquence identique PTAP au domaine UEV de TSG101 dont la structure cristalline est résolue. Ces structures révèlent que le domaine UEV se lie à PTAP sur un site à proximité des résidus à l'interface avec l'ubiquitine de sorte que ce domaine puisse à la fois se lier à l'ubiquitine et à PTAP. Cette interaction UEV/PTAP fait intervenir la méthionine 95 de l'UEV qui est cruciale dans l'interaction. La mutation de ce résidu induit une diminution d'interaction *in vitro* avec les protéines virales et avec la séquence PSAP de ALIX suggérant un mode d'interaction identique UEV/PSAP ALIX. La mutation du résidu M95 de TSG101 abolit partiellement sa fonction dans la cytokinèse, suggérant que l'interaction entre TSG101 et ALIX joue un rôle durant ce processus [402].

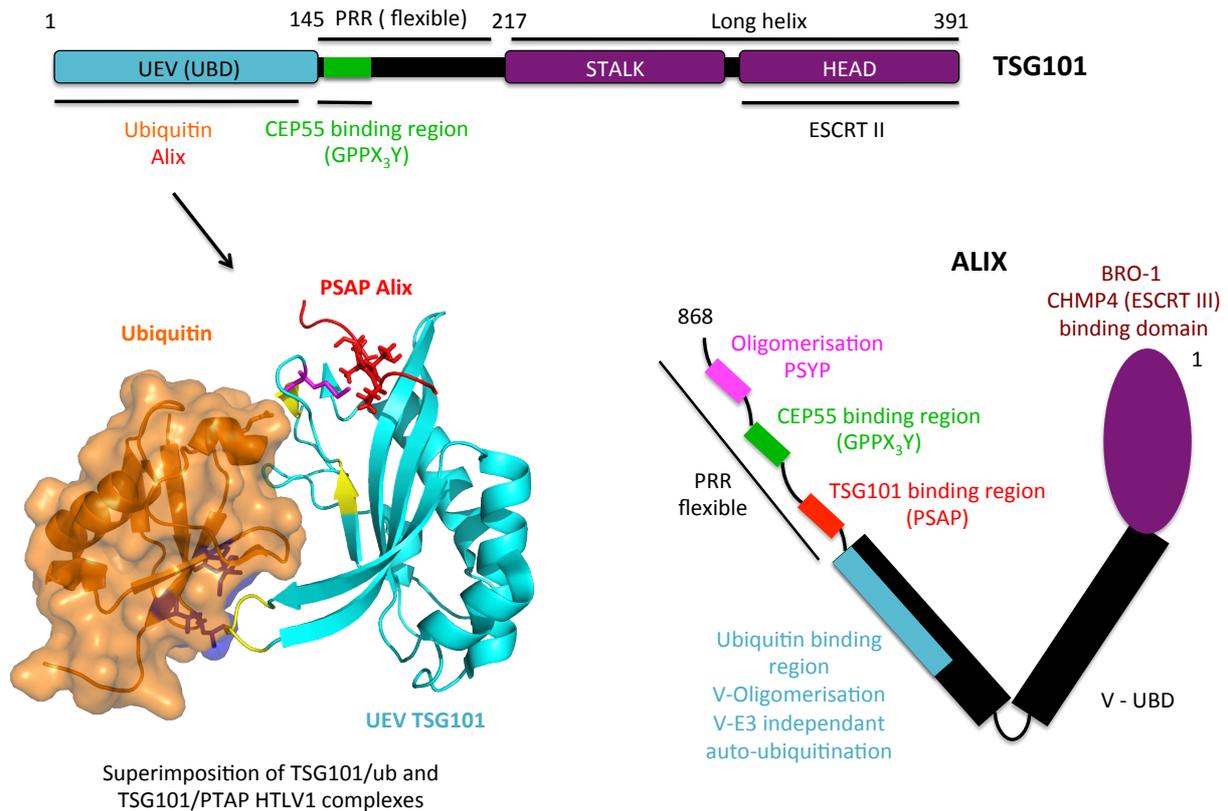


Figure 48 : Domaines fonctionnels de ALIX et de TSG101
 (Cf .texte).

Ensuite, il a été montré que le domaine UBD d'ALIX formait des multimères de façon dépendante de l'ubiquitine *in vitro* [122] (figure 48).

De plus, la séquence PSYP qui est présente dans la partie C-terminale de la région PRR semble être cruciale dans la multimérisation de la protéine [357]. Il a été révélé de façon élégante, par des expériences de co-immunoprécipitation, que la capacité de multimérisation d'ALIX était déterminante dans l'interaction efficace d'ALIX avec TSG101. En effet, la mutation des résidus PSYP entraîne une forte diminution de l'interaction de ces protéines couplée à un défaut de multimerisation d'ALIX. Afin de déterminer si la séquence PSYP était directement impliquée dans l'interaction avec TSG101, les auteurs ont utilisé une chimère d'ALIX dans laquelle ils ont substitué la séquence PSYP par une séquence leucine-Zipper connue pour former des multimères stables. Dans ces conditions ils ont observé une augmentation élevée de l'interaction entre TSG101 et ALIX montrant que PSYP n'est pas impliquée directement dans l'interaction ALIX/TSG101 mais que c'était sa capacité à multimériser qui permettait une interaction forte avec TSG101 [357].

Par ailleurs, un mutant d'ALIX sur les séquences PSAP et PSYP ne restaure que faiblement les défauts d'abscission induits par la déplétion d'ALIX pendant la cytokinèse. Ceci montre que la capacité de multimérisation d'ALIX et/ou la capacité à interagir avec TSG101 contribue fortement au rôle joué par ALIX durant l'abscission [357].

Ainsi, de nombreuses évidences suggèrent que le Centralspindlin, CEP55, ALIX et TSG101 formeraient des structures multimériques d'ordre supérieur qui s'assembleraient pour former un complexe supra-moléculaire hautement organisé (SMOC) régulant l'abscission. La découverte du rôle des SMOC dans la régulation de différents processus cellulaires est en pleine expansion [486]. Dans la voie de signalisation NF- κ B par exemple, l'activation de la voie est accompagnée de la formation de macro-complexes constitués d'un réseau de protéines extrêmement organisé sous la membrane plasmique [487]. La formation de ces SMOC est indispensable à l'activation complète de la voie de signalisation. De façon intéressante, la formation de ces macro-complexes est fortement dépendante de l'interaction entre NEMO et des chaînes de poly-ubiquitine permettant une activation efficace de la cascade moléculaire qui en découle [487].

3. Implications fonctionnelles de CEP55 durant l'abscission

CEP55 s'impose aujourd'hui comme un régulateur clé du processus d'abscission. Il a été montré que CEP55 était impliqué à la fois dans le recrutement de la machinerie ESCRT au niveau du pont intercellulaire mais également dans l'intégrité et la structure du midbody.

La déplétion de CEP55 s'accompagne de forts défauts de cytokinèse caractérisés par des retards d'abscission et par la formation de cellules multinucléées [356, 443, 481]. De plus, la déplétion de CEP55 conduit à des défauts du même ordre que l'addition des défauts de cytokinèse suite à la déplétion de ALIX et de TSG101 suggérant que la fonction principale de CEP55 dans l'abscission est le recrutement de ces deux protéines [443].

De façon frappante, les déplétions d'ALIX et de CEP55 sont accompagnées de la formation d'un grand nombre de cellules multinucléées alors que celle de TSG101 s'accompagne d'un nombre de cellules multinucléées bien plus faible [443, 447].

Ainsi, en plus du rôle commun d'ALIX et de TSG101 dans le processus d'abscission en recrutant de façon parallèle la machinerie ESCRT-III au midbody, ALIX et CEP55 présenteraient à la différence de TSG101 un rôle de stabilisation du pont intercellulaire.

De nombreuses études ont montré que CEP55 et ALIX joueraient un rôle de stabilisation du pont intercellulaire important [356, 357, 482].

CEP55 et ALIX seraient impliquées dans l'intégrité du midbody ce qui pourrait favoriser une déstabilisation du pont intercellulaire globale lorsque ces protéines sont déplétées [356, 357, 482]. En accord avec cela, il a été observé que la déplétion de ces protéines conduisait à la formation de cellules multinucléées suite à un retard prolongé d'abscission, plus de 7 h après la formation du pont intercellulaire, mais également de façon bien plus précoce, moins d'une heure après la formation du pont intercellulaire [443, 447].

De plus, CEP55 et ALIX semblent être impliquées dans la voie « NoCut ». Ce check-point d'abscission est crucial dans la stabilité du pont intercellulaire lorsqu'il contient des ponts d'ADN même si les événements moléculaires responsables de ce processus ne sont pas connus. La formation de certaines cellules multinucléées suite à la déplétion d'ALIX et de CEP55 pourrait ainsi être due à l'implication de ces protéines dans « NoCut ».

Comme décrit précédemment, la « dark-zone » est caractérisée par une telle densité protéique qu'elle est insensible à un immuno-marquage notamment de la tubuline. Plusieurs études indépendantes montrent que la déplétion de CEP55 ou de ALIX peut induire un immuno-marquage de la tubuline au niveau de cette zone conduisant à un marquage de la tubuline continu dans l'ensemble du pont intercellulaire (figure 49 : comparer le marquage de la tubuline après la déplétion de CEP55) [356, 357, 402]. Ceci montre que ces protéines régulent la densité protéique au niveau de la « dark-zone ». TSG101 qui est localisée aux extrémités de la région corticale centrale du midbody ne présente pas cette propriété.

De plus, une étude a révélé que la déplétion de CEP55 modifiait la localisation de différentes protéines autres que les protéines ESCRT dans les phases tardives de la maturation du pont-intercellulaire (Figure 49). Même si ces résultats sont issus d'une seule étude et doivent donc être interprétés avec précaution, ils indiquent un rôle primordial de CEP55 dans l'intégrité du midbody [356]. Les protéines MKLP2 et Aurora B semblent être complètement absentes du pont intercellulaire dans les phases tardives de maturation du pont intercellulaire après la déplétion de CEP55. En outre, les protéines ECT-2, Anniline et PRC1 présentent une localisation plus diffuse au niveau du midbody et du pont intercellulaire suite à la déplétion de

CEP55 [356]. Les auteurs ont proposé que le rôle de CEP55 dans la localisation des protéines pré-citées était dû à un rôle de structuration du midbody et non à une interaction directe entre CEP55 et ces protéines. En effet, ils n'ont pas observé de co-immunoprécipitation de CEP55 avec ces protéines alors qu'une co-immunoprécipitation de CEP55 avec MKLP1 a été observée. Ainsi, on notera ici que le rôle de CEP55 dans la maintenance de l'intégrité du midbody semble être couplé à son rôle dans la voie « NoCut » car la déplétion de CEP55 conduit à un défaut de localisation d'Aurora B au niveau du pont intercellulaire dans les phases tardives de cytokinèse [356].

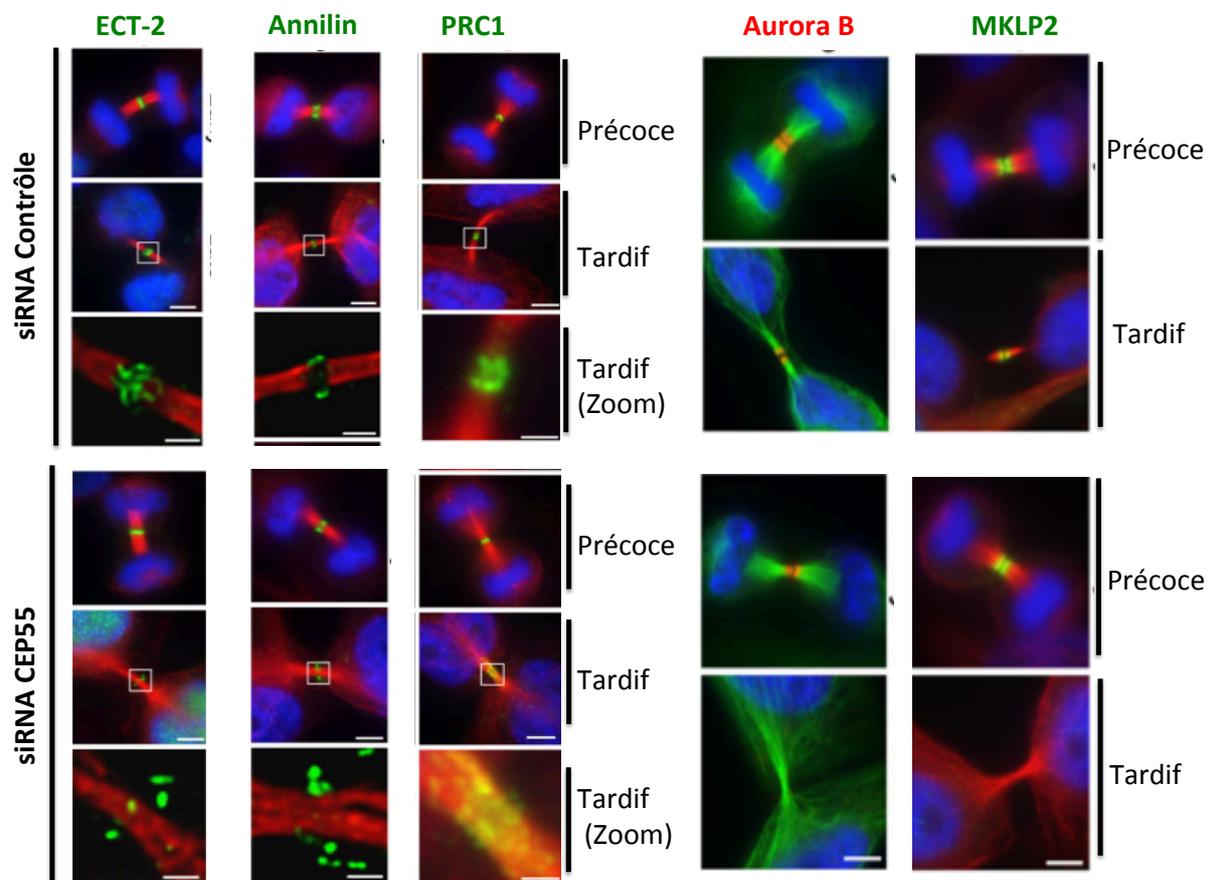


Figure 49 : CEP55 est impliquée dans l'intégrité du midbody

Images extraites de [356]. Précoce, tardif : pont intercellulaire précoce et tardif. (Cf. texte).

Une autre implication de CEP55 dans la voie « NoCut » est liée au recrutement d'ALIX au midbody. En effet, ALIX serait à la fois importante au processus d'abscission mais pourrait être également impliquée dans la voie « NoCut » [447]. La déplétion d'ALIX conduit à un défaut de recrutement de CHMP4C qui est importante dans la voie « NoCut ». De plus, il a été montré que CHMP4C interagissait directement avec ALIX. Par ailleurs, il a

pu être observé une résorption du pont intercellulaire lorsque cette protéine était déplétée dans des cellules qui présentent un pont d'ADN formant des cellules multinucléées. Ce phénotype est typique des protéines impliquées dans « NoCut » [447]. Néanmoins, de nombreuses cellules qui ne présentent pas de pont d'ADN forment également des cellules multinucléées suggérant que la formation de cellules multinucléées proviendrait d'autres fonctions portées par ALIX qui pourraient notamment provenir de son rôle dans le maintien de l'intégrité du midbody.

En résumé, CEP55 recrute au midbody les protéines ALIX et TSG101 qui recrutent en parallèle au pont intercellulaire la machinerie ESCRT-III indispensable au processus d'abscission. De plus, CEP55 et ALIX ont un rôle dans la stabilisation du pont intercellulaire en étant à la fois impliquées dans l'intégrité du midbody et dans la voie « NoCut » ce qui ne semble pas être le cas de TSG101.

Par ailleurs, dans la même étude qui a montré le rôle crucial de CEP55 dans l'intégrité du midbody, CEP55 a également été décrite comme étant liée au trafic vésiculaire (figure 50).

La déplétion de CEP55 par siRNA conduit à un défaut de recrutement de la protéine v-SNARE VAMP8 au niveau du midbody qui est absente du midbody dans les phases tardives de maturation du pont intercellulaire. Elle conduit également à une localisation plus diffuse au sein de l'ensemble du pont intercellulaire de la protéine T-SNARE Syntaxin-2 [356]. Lors de la parution de cette étude, la fonction des ESCRT dans l'abscission n'était pas connue et les auteurs ont proposé que CEP55 pourrait permettre le recrutement des protéines SNAREs au midbody permettant l'abscission. Néanmoins, ces défauts de recrutement peuvent être dus à un défaut de structuration du midbody et le rôle direct de recrutement de CEP55 dans le recrutement des protéines VAMP8 et Syntaxin-2 au midbody reste encore à être vérifié [356].

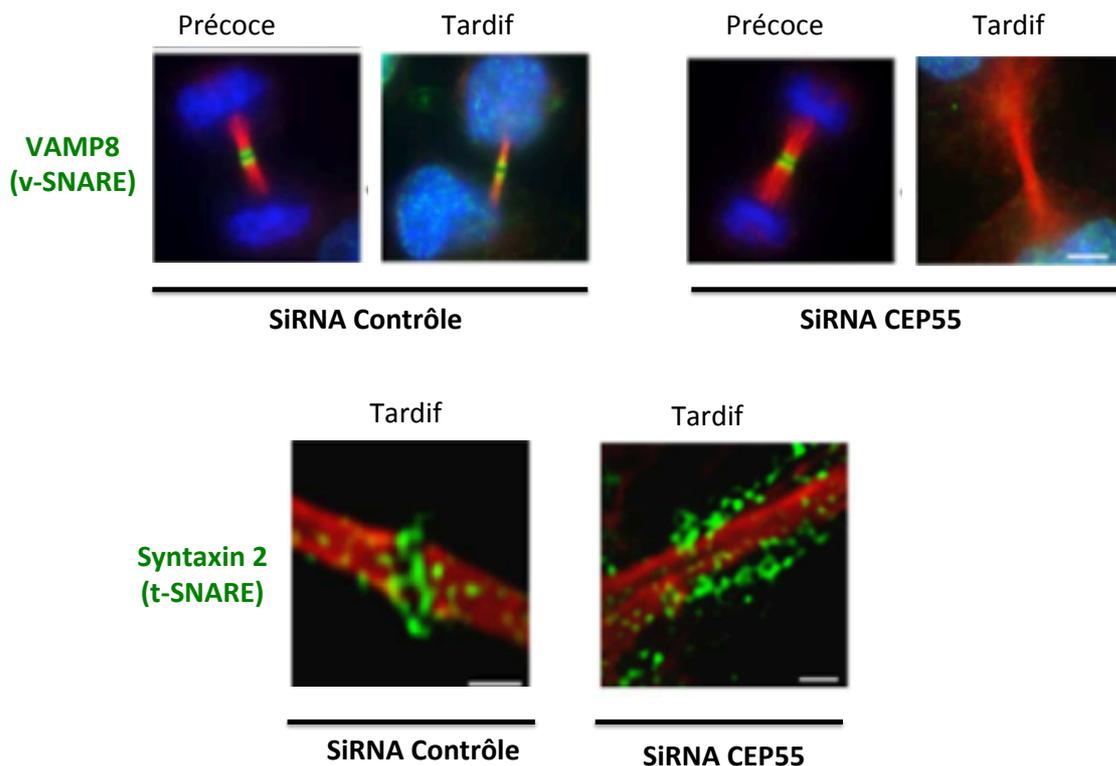


Figure 50 : CEP55 et le trafic vésiculaire

Images extraites de [356]. Précoce, tardif : pont intercellulaire précoce et tardif. (Cf. texte).

Ainsi, de par la fonction fondamentale portée par CEP55 dans la stabilité du pont intercellulaire et dans le processus d'abscission, il n'est pas étonnant que la cellule ait mis en place un système de régulation permettant de contrôler finement l'activité de cette protéine.

4. Régulation de CEP55 par phosphorylation et trans-isomérisation

Trois évènements de phosphorylation séquentiels dans la région riche en proline (PRR) de CEP55 régulent la fonction de CEP55 (figure 51).

Les sérines 425 et 428 sont phosphorylées par les kinases CDK1 et ERK2 (*extracellular signal-regulated kinase 2*) en début de mitose [481]. L'impact de ces phosphorylations dans la fonction portée par CEP55 durant la cytokinèse n'est pas bien caractérisé. Les auteurs ont montré que la surexpression de mutants non phosphorylables S245A et S428A conduisait à des défauts d'abscission plus élevés que la surexpression de CEP55 WT [481]. Cependant, les auteurs n'ont pas contrôlé le niveau d'expression des différentes protéines. Par ailleurs, ils ont observé que le mutant S425A/S428A de CEP55 ne se dissociait pas des centrosomes mais aucun défaut de recrutement au midbody de ces mutants n'a été mesuré [481].

Néanmoins, ces résidus sont chacun suivis d'une proline. La phosphorylation de ces résidus favorise l'interaction de CEP55 avec une prolyl cis-trans isomérase PIN1 (*peptidyl-prolyl cis-trans isomerase nima-interacting 1*) ce qui permettrait l'isomérisation de la région riche en proline de CEP55 [488] (figure 51). La déplétion de PIN1 par siRNA dans des cellules HeLa et des cellules « Knock-Out » PIN1^{-/-} conduisent à des défauts d'abscission mais qui semblent moins importants que ceux induits par la déplétion de CEP55 suggérant que PIN1 contribue en partie à la fonction portée par CEP55 durant la cytokinèse.

De plus, il a été montré que ces premiers types de régulation favorisaient la phosphorylation de la sérine 436 de CEP55 par PLK1 [481, 488]. L'ensemble de ces événements moléculaires augmenterait la stabilité de CEP55 en mitose qui serait moins sujette à la dégradation par le protéasome même si les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas compris [489]. Néanmoins l'utilisation d'un mutant phosphomimétique S436E montre que cette stabilisation de CEP55 en mitose ne serait dépendante que du résidu S436, que la contribution des autres événements de phosphorylation et de trans-isomérisation proviendrait du fait qu'ils favorisent cette phosphorylation sur la sérine 436.

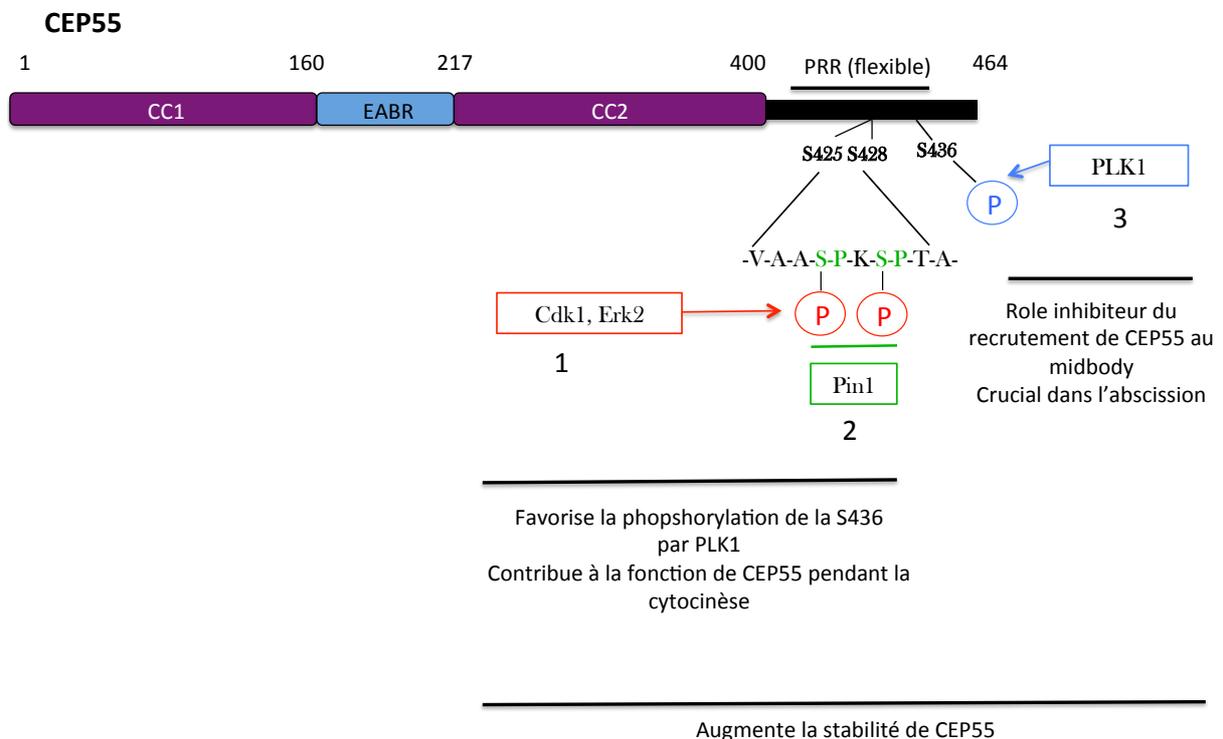


Figure 51 : CEP55 est régulée par des événements de phosphorylation et d'isomérisation dans les phases précoces de la mitose
(Cf. texte)

PLK1 est une kinase mitotique très importante. Elle est présente au niveau des centrosomes et des kinétochores puis elle se relocalise au niveau du fuseau central en anaphase en interagissant avec la protéine PRC1. Cette kinase est progressivement dégradée par l'E3 ligase APC/Cdh1 puis est reconnue par le protéasome durant la sortie de mitose. Elle joue un rôle déterminant dans le couplage temporel entre la mitose et l'abscission en régulant l'activité de CEP55 [482].

Il a pu être montré que PLK1 inhibait le recrutement précoce de CEP55 au midbody en phosphorylant sa sérine 436. CEP55 WT est recrutée au niveau du midbody environ une heure après le déclenchement de l'anaphase alors que le mutant S436A est recruté immédiatement (5 min) après le déclenchement de l'anaphase au niveau du fuseau central [482]. Ceci est associé à une intensité de marquage de CEP55 au midbody plus élevée. L'utilisation d'inhibiteurs de PLK1 conduit au même phénotype (Figure 52).

D'un point de vue mécanistique les auteurs ont observé que l'interaction avec MKLP1 (directe ou indirecte) était inhibée lorsque CEP55 était phosphorylée sur sa sérine 436. De plus, de façon étonnante, il a été montré que ce recrutement précoce de CEP55 durant l'anaphase conduisait à des défauts d'abscission [482, 490]. Notamment, un défaut de recrutement des protéines telles que ALIX et TSG101 ainsi que le complexe ESCRT-III et VPS4 au niveau du midbody a été observé dans les phases tardives de maturation du pont intercellulaire [482, 490]. Ainsi CEP55 et PLK1 jouent un rôle essentiel dans la coordination temporelle entre l'ingression du sillon de division et l'abscission. Quand PLK1 est dégradée en fin de mitose, CEP55 est déphosphorylée par une phosphatase non identifiée et est finalement recrutée au midbody permettant une abscission normale.

Néanmoins, l'explication moléculaire à l'absence de recrutement des ESCRT au midbody lorsque CEP55 est recrutée de façon précoce au niveau du fuseau central n'est pas connue. Il a été proposé que l'accumulation de CEP55 au midbody conduirait à un défaut de structuration du midbody et ainsi à un défaut de recrutement des ESCRT [482].

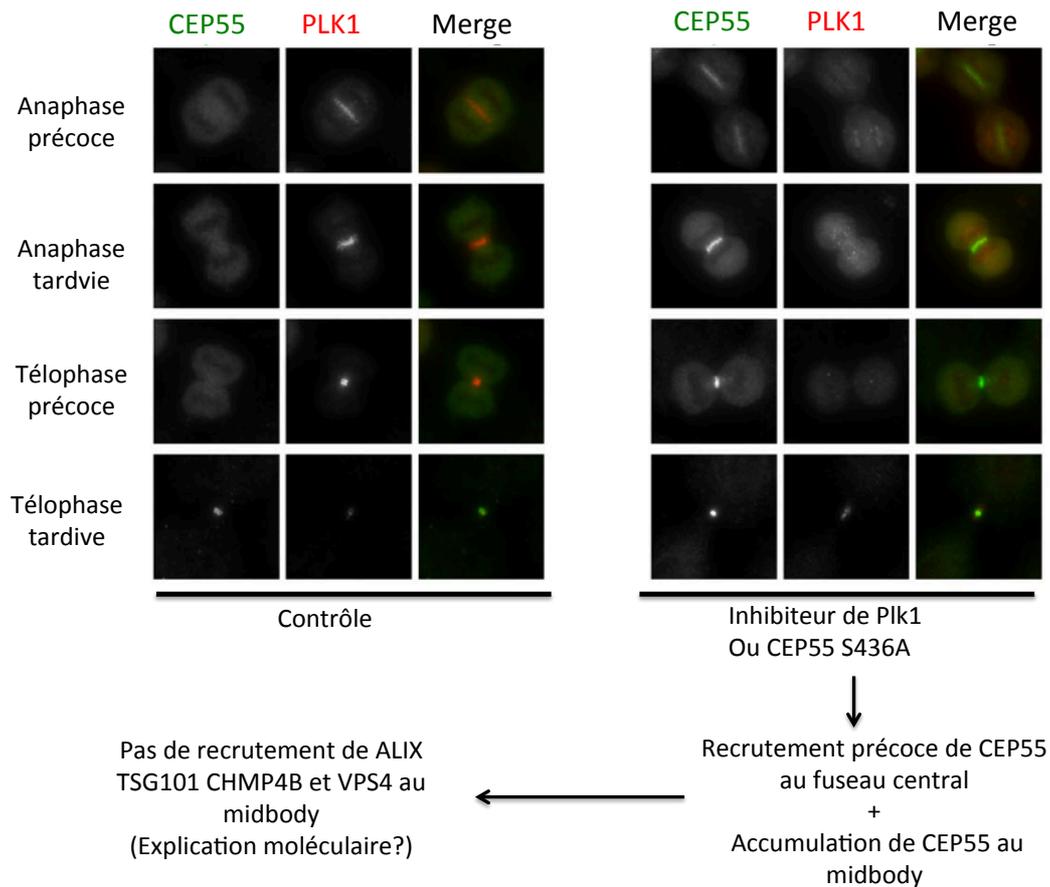


Figure 52 : PLK1 inhibe le recrutement précoce de CEP55 au midbody ce qui permet une coordination temporelle entre la mitose et l'abscission

Extrait de [482]. (Cf. texte)

Une étude intéressante montre que MTMR3 et MTMR4 (*myotubularin-related protein 3-4*) jouent un rôle important dans l'abscission [491]. Les déplétions par siRNA de MTMR3 et de MTMR4 conduisent à des défauts d'abscission [491]. MTMR4 présente une séquence GPPX₃Y conservée avec ALIX et TSG101 qui lui permettrait d'interagir avec CEP55 par EABR. Une mutation de la tyrosine de MTMR4 conduit à une perte d'interaction avec CEP55 et à une incapacité du mutant à corriger les défauts d'abscission induits par la déplétion de MTMR4 [491]. Par ailleurs, la surexpression de cette protéine conduit également à des défauts d'abscission.

De façon intéressante, MTMR4 a été décrite comme interagissant directement avec MTMR3. De plus, MTMR3 interagit avec PLK1 et il a été proposé que l'interaction entre MTMR3 et MTMR4 permettrait ainsi de former un complexe rapprochant PLK1 de CEP55 facilitant ainsi la phosphorylation de CEP55 par PLK1 dans les phases précoces de la mitose[491]. Cela est en accord avec le fait que la sérine 436 de CEP55 n'est pas présente

dans un site de phosphorylation consensus de PLK1 qui suggérait que PLK1 n'interagissait pas directement avec CEP55 [482]. Des mutations des résidus importants dans l'interaction MTMR3-MTMR4, MTMR4-CEP55 ou MTMR3-PLK1 conduisent à des défauts d'abscission [491].

Plus précisément, la déplétion de MTMR3 conduit à un marquage de CEP55 beaucoup plus intense au niveau du midbody suggérant que, comme PLK1, MTMR3 jouerait un rôle inhibiteur du recrutement de CEP55. Une restauration de l'intensité du marquage de CEP55 est observée par l'expression de MTMR3 WT mais pas pour des mutants d'interaction de MTMR3 avec MTMR4 ou PLK1. Ici, les défauts d'abscission sont probablement dus au recrutement précoce de CEP55 au midbody de la même façon que ce qui est observé lorsque PLK1 est inactivée.

De façon surprenante, les auteurs ont observé que contrairement à la déplétion de MTMR3, celle de MTMR4 conduisait à une diminution du recrutement de CEP55 au midbody, alors que le marquage de MKLP1 y est inchangé. Ce phénotype est restauré par l'expression de MTMR4 WT et non par l'expression du mutant d'interaction de MTMR4 avec CEP55.

Cependant, l'expression du mutant de MTMR4 qui n'interagit pas avec MTMR3 conduit au même phénotype que la déplétion de MTMR3 à savoir une intensité de marquage de CEP55 beaucoup plus intense au midbody.

Ces résultats suggèrent que MTMR3 et MTMR4 sont impliquées dans deux processus distincts. L'inhibition de recrutement de CEP55 au midbody en début de mitose serait médiée par la formation d'un complexe quaternaire CEP55/MTMR4/MTMR3/PLK1 permettant la phosphorylation de CEP55 par PLK1 (figure 53). Par ailleurs, MTMR4 jouerait un rôle supplémentaire positif dans le recrutement de CEP55 au midbody bien que les auteurs n'aient pas identifié de localisation de MTMR4 au midbody.

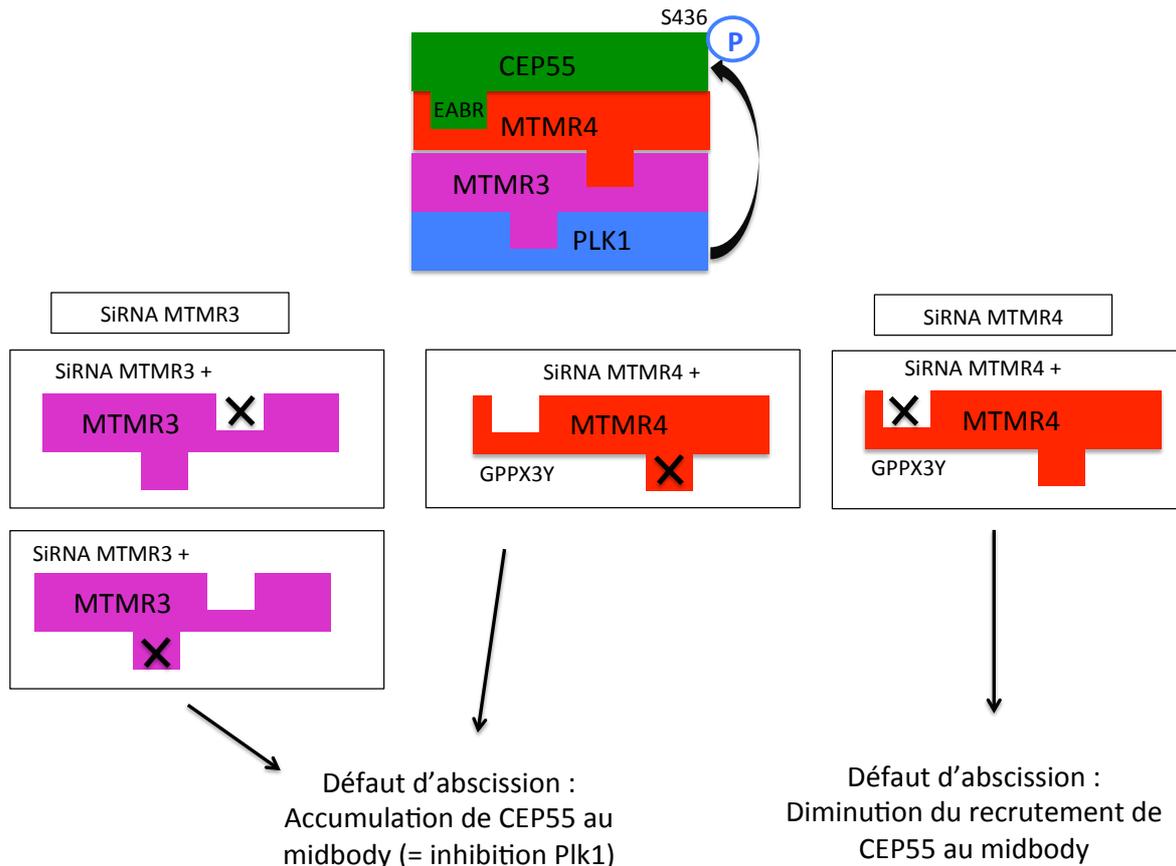


Figure 53 : Les protéines MTMR3 et MTMR4 jouent un rôle crucial dans l'abscission en régulant le recrutement de CEP55 au midbody en mitose
(Cf. texte)

En conclusion, CEP55 s'impose aujourd'hui comme un régulateur clé du processus d'abscission. CEP55 joue un rôle crucial dans le recrutement des ESCRT, dans l'intégrité du midbody. Son recrutement est finement régulé en mitose pour permettre une coordination temporelle entre la sortie de mitose et le déclenchement de l'abscission. Dans un organisme adulte CEP55 est majoritairement exprimée dans les testicules et les ovaires [481]. De façon intéressante, la situation de ces cellules illustre également le rôle déterminant de CEP55 dans le processus d'abscission.

B. Cytocinèse sans abscission : les cellules germinales et l'inhibition naturelle de CEP55

Durant la spermatogénèse les cellules se divisent successivement en inhibant complètement l'abscission. Cela conduit à une accumulation de cellules qui sont séparées par un pont intercellulaire particulièrement stable formant un syncytium. Il peut contenir plus d'une centaine de cellules qui se différencient de façon synchrone grâce aux différents ponts intercellulaires connectant les différentes cellules. Dans ce cas particulier, l'inhibition de l'abscission est indispensable à la formation du syncytium qui joue un rôle essentiel dans la spermatogénèse et dans la fertilité des souris mâles.

De façon intéressante, CEP55 qui est fortement exprimée dans ces cellules, présente comme dans les cellules somatiques une localisation au niveau de la région centrale du midbody [492]. Néanmoins, les ESCRT ne sont pas recrutés alors qu'ALIX et TSG101 sont exprimées dans ces cellules [493, 494].

Dans les cellules germinales, une kinase inactivée nommée TEX14 est présente au niveau du midbody. Cette protéine présente également un motif GPPX3Y qui interagit stablement avec CEP55 permettant une inhibition du recrutement des protéines ALIX et TSG101 au niveau du pont. L'inactivation du gène *TEX14* (*testis expressed gene 14*) dans les souris inhibe la formation d'un syncytium organisé ce qui conduit à leur infertilité [495-497].

La structure cristalline du complexe entre l'EABR de CEP55 et le motif GPPX3Y de TEX14 a été résolue montrant une interaction globalement similaire à celle du complexe ALIX/CEP55 [494], avec toutefois une affinité légèrement supérieure du complexe TEX14/EABR (300 nM) comparée à celle de ALIX/EABR (1 μ M).

Il a été proposé que l'inhibition totale du recrutement d'ALIX et de TSG101 provenait surtout d'une hiérarchie de recrutement différente dans les cellules germinales conduisant à une forte concentration de TEX14 à proximité de CEP55 avant que ce ne soit le cas pour ALIX et TSG101. Dans les cellules somatiques, MKLP1 recrute CEP55 qui recrute à son tour ALIX et TSG101. Dans les cellules germinales, MKLP1 est d'abord recrutée ce qui est suivi du recrutement de TEX14 et finalement de celui de CEP55 au midbody. Ainsi la concentration locale de TEX14 au midbody est bien supérieure à celle de ALIX et de TSG101, inhibant ainsi le recrutement de ces protéines par une interaction stable avec CEP55 [494] (figure 54).

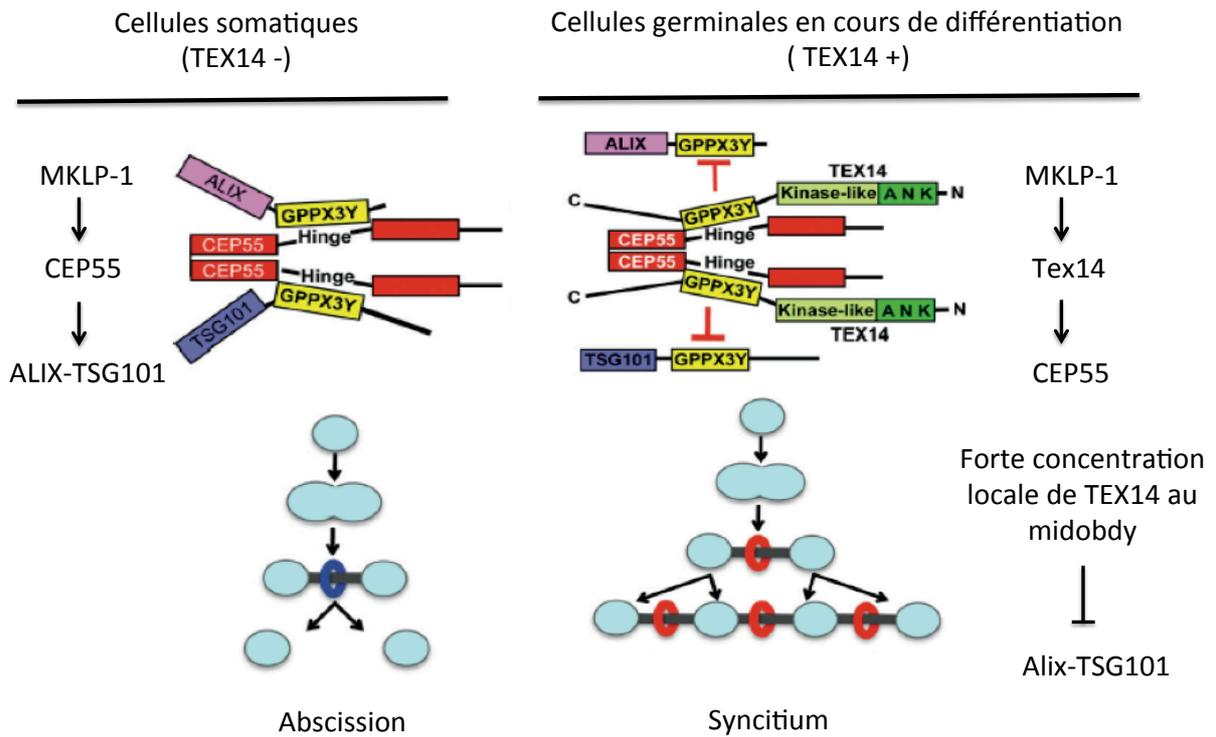


Figure 54 : Mécanisme de formation d'un syncytium dans les cellules germinales par l'inhibition de l'interaction CEP55/ALIX -TSG101

(Cf. texte)

Il est possible que d'autres facteurs permettent d'inhiber l'abscission dans les cellules germinales. Ces études montrent néanmoins l'importance de CEP55 et des ESCRT dans le processus d'abscission.

C. Autres fonctions de CEP55

Différentes études ont permis de montrer que CEP55 était impliquée également dans d'autres fonctions cellulaires.

Deux études ont identifié CEP55 comme étant un régulateur de la dégradation des midbody remnant (MR). Une étude montre que la déplétion de CEP55 par siRNA est accompagnée d'une accumulation des MR dans les cellules [466].

Une autre a proposé que CEP55 soit impliquée dans l'autophagie des MR en recrutant le récepteur de l'autophagie NBR1 au midbody en fin de processus de maturation du pont [469]. L'implication de CEP55 dans l'autophagie des MR n'a cependant pas été clairement montrée.

Les auteurs ont observé une co-immunoprécipitation entre CEP55 et NBR1. Une déplétion de NBR1 ou la surexpression de CEP55 conduit à une accumulation des MR dans les cellules. Les auteurs ont proposé que la surexpression de CEP55 conduisait à l'apparition de formes insolubles de CEP55 dans le cytoplasme séquestrant ainsi NBR1 ce qui diminue alors la concentration de cette dernière aux MRs [469]. Cela conduirait à une inhibition de la dégradation des MRs par autophagie.

CEP55 est également impliquée dans l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR (*phosphatidylinositol 3-kinase/PKB protein kinase b/ mammalian target of rapamycin*).

On a longtemps pensé que le lien entre CEP55 avec la voie de signalisation PI3K/Akt n'existait que dans des cellules cancéreuses. Cependant, des études récentes suggèrent que le rôle de CEP55 dans l'activation de cette voie pourrait jouer un rôle physiologique.

Cette voie de signalisation intracellulaire joue un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire en régulant des processus tels que l'apoptose, le cycle cellulaire, la croissance ou l'angiogénèse [498, 499]. L'hyper activation de cette voie a été observée dans un grand nombre de cancers [500]. Elle est déclenchée par la phosphorylation activatrice de PI3K par des récepteurs à tyrosine kinases transmembranaires (ou par la protéine RAS).

PI3K, constituée d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110), est une kinase qui phosphoryle des phosphoinositides bis-phosphate PIP2 les convertissant en phosphoinositides tris-phosphate (PIP3). L'accumulation de PIP3 au niveau de la membrane plasmique permet le recrutement et l'activation par phosphorylation de la sérine thréonine kinase Akt sous la membrane plasmique. Akt phosphorylée présente un grand nombre de substrats intracellulaires comme mTOR une autre sérine thréonine kinase qui est activée par la phosphorylation d'Akt. La régulation de la localisation d'Akt et son activation sont finement régulées par sa poly-ubiquitination par des chaînes K63 par les E3-ligases TRAF6 et NEDD4 [501-503]. Notamment, les chaînes de poly-ubiquitine conjuguées par TRAF6 facilitent le recrutement d'Akt sous la membrane plasmique.

Dans des cellules cancéreuses, CEP55 interagit avec la sous-unité catalytique de PI3K, p110 par interaction directe ou indirecte [504]. Cette interaction conduirait à la stabilisation

de cette sous-unité par un mécanisme inconnu entraînant une augmentation de l'activation d'Akt sous la membrane plasmique. L'interaction entre CEP55 et p110, déclenchée par VEGF-A (*vascular endothelial growth factor A*) qui est un ligand extracellulaire du récepteur à tyrosine kinase VEGF, permettrait ainsi le recrutement de CEP55 sous la membrane plasmique [505]. Un autre récepteur transmembranaire nommé Fibulin-5, capable d'interagir avec la matrice extracellulaire, a été montré comme activant la voie PI3K/Akt de façon dépendante de CEP55 [506].

Il a récemment été révélé un rôle crucial de CEP55 dans des embryons de poisson zèbre en régulant la voie PI3K/Akt [507]. Des embryons génétiquement modifiés ont été générés. Ils présentent une mutation mimant un « Knock/out » de CEP55 par l'apparition d'un codon stop prématuré conduisant à une protéine tronquée de 39 acides aminés (notée CEP55 mut/mut). Les embryons hétérozygotes se développaient normalement, alors que les embryons homozygotes présentaient des défauts de développement sévères accompagnés d'une létalité des larves entre 5 et 7 jours après fertilisation (figure 55). Le même phénotype a été observé par injection de morpholinos dirigés contre CEP55 [507].

Par ailleurs, une hydrocéphalie (formation d'une protubérance aqueuse dans le cerveau) associée à l'apparition d'oedèmes au niveau du cerveau a été observée (figure 55). Les larves CEP55 mut/mut présentent également des yeux plus petits, une mâchoire malformée et des défauts dans d'autres organes comme l'intestin, la vessie natatoire et la queue. Ces malformations sont associées à des phénomènes d'apoptose massifs accompagnés d'une augmentation de cellules aneuploïdes (> 4N), un phénotype probablement lié à la perte de fonction de CEP55 dans la cytotinèse [507].

Les auteurs ont proposé que CEP55 puisse jouer un rôle déterminant dans l'activation de la voie Akt qui est connue pour son rôle dans l'apoptose. Ils ont mis en évidence que dans les embryons CEP55 mut/mut le niveau d'expression de la protéine Akt était fortement diminué. De plus, ils ont montré que la durée de vie d'Akt était diminuée dans ces embryons ce qui pourrait expliquer le phénotype observé. Ils en ont déduit que CEP55 stabiliserait Akt, permettant un rôle protecteur direct ou indirect de sa dégradation par le protéasome (figure 55). En accord avec cette hypothèse, l'inhibition du protéasome par la drogue MG132 et l'injection d'un ARNm codant pour la protéine Akt ont permis de restaurer partiellement les phénotypes observés dans les embryons CEP55 mut/mut [507]. Cette étude montre que le gène codant pour CEP55 est essentiel chez le poisson zèbre.

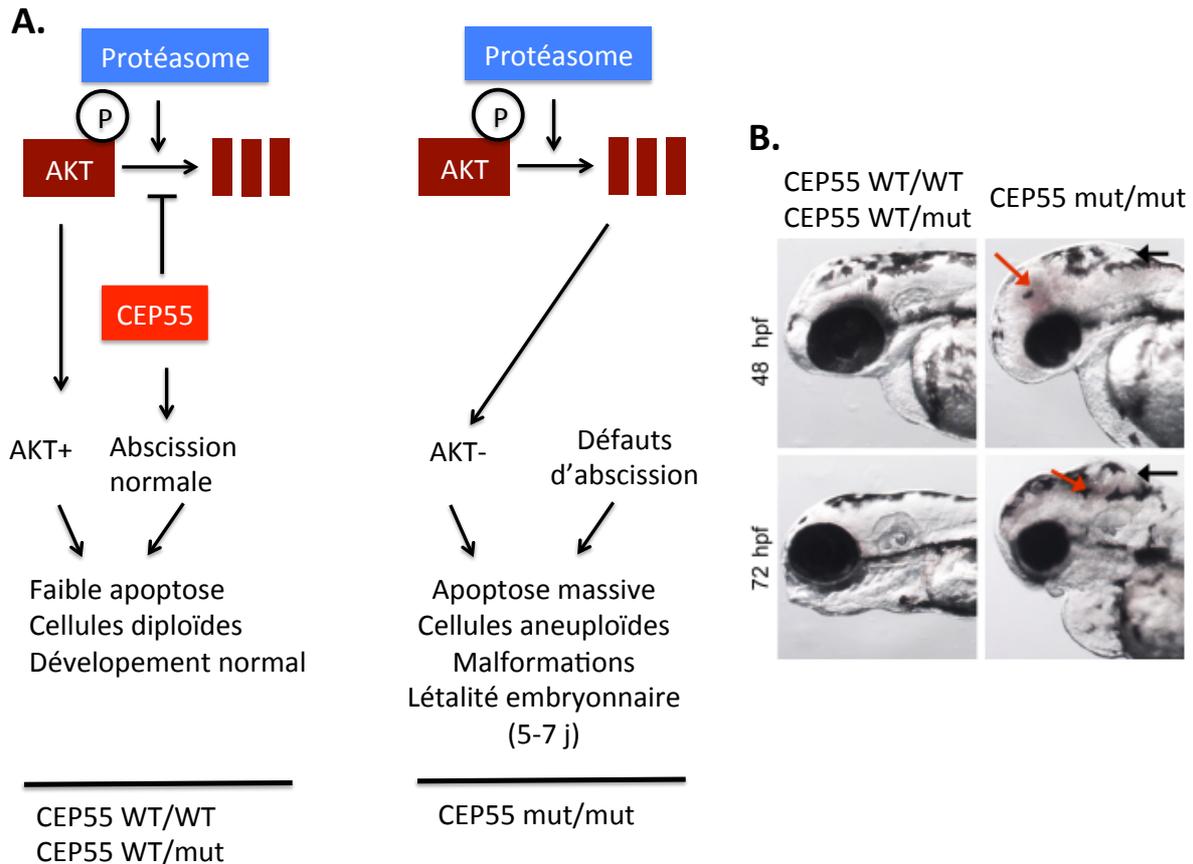


Figure 55 : CEP55 est essentiel chez le poisson zèbre

- A.** Une perte d'activité de CEP55 est associée à des défauts d'abscission et à une diminution de l'activation de la voie PI3K AKT qui semblent être impliqués dans l'apoptose massive des cellules.
- B.** Inspiré de [507]. La perte d'activité de CEP55 conduit à de nombreuses malformations dont l'apparition d'une hydrocéphalie (flèche noire) et d'oedemes (flèche rouge).

Une étude récente a mis en évidence que CEP55 présentait également une fonction de régulation du réseau vasculaire neural chez le rat [508]. En injectant des mévinphos dans la moelle ventrolatérale rostrale de rats afin d'étudier leur toxicité, les auteurs ont pu mettre en évidence une augmentation de la voie de signalisation PI3K/Akt de façon dépendante de CEP55. Cela conduit à une suractivation de la voie oxyde nitrique synthase (NOS2) conduisant à une hypotension et à la diminution de la contraction des muscles lisses dans les vaisseaux sanguins. L'utilisation d'anticorps neutralisants contre CEP55 permet une diminution de l'activation PI3K/Akt et restaure significativement ces effets physiologiques.

D. Pathologies humaines associées à une dérégulation de CEP55

1. CEP55 et cancers

De par son rôle clé à la fois dans la division cellulaire et dans la régulation de la voie PI3K/Akt, il n'est pas surprenant qu'un lien entre la dérégulation de l'activité de CEP55 et le développement tumoral ait pu être mis en évidence.

La grande majorité des articles publiés sur CEP55 portent sur son lien avec les cancers [509]. De nombreuses études ont révélé un niveau d'expression anormalement élevé de CEP55 dans de nombreux cancers tels que ceux du colon[510], du foie[504], du poumon [505], du sein [511], du col de l'utérus [512], du cou et de la tête [513], de l'estomac [514], de la prostate [515], de la vessie [516], des ovaires [517], de la thyroïde [518, 519], du cerveau [520], des voies respiratoires [521] et du larynx [522] ainsi que de l'œsophage [523].

De façon générale, les défauts de cytotinèse conduisent à la formation de cellules aneuploïdes, une situation connue pour induire une instabilité chromosomique favorisant la formation de cellules cancéreuses [524-527]. Une sous-régulation ou une surexpression de CEP55 peuvent conduire à des défauts de cytotinèse dans des cellules en culture [481]. A ma connaissance, la totalité des études révèlent que c'est la surexpression de CEP55 et non sa sous-expression qui est associée aux cancers. Une étude a mis en évidence, que sur 12 types de cancers différents qui présentent des signatures d'instabilité chromosomique, CEP55 faisait partie des 70 gènes les plus surexprimés [528]. Une autre étude a associé CEP55 aux 10 gènes les plus surexprimés dans des tumeurs qui présentent une forte résistance aux médicaments, une forte prolifération cellulaire et une instabilité chromosomique [529]. De plus, la surexpression de CEP55 a été associée à une augmentation du pouvoir métastatique de nombreux cancers [505, 513, 530].

Un grand nombre d'équipes indépendantes ont d'ailleurs proposé d'utiliser CEP55 comme un marqueur de progression tumorale pour apporter une valeur pronostique notamment sur le stade tumoral, l'agressivité et/ou le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses [509, 511-513, 515, 530]. C'est le cas par exemple dans les cancers à cellules squameuses du cou et de la tête, du col de l'utérus, du sein, de l'œsophage et dans le cas d'un cancer récidivant de la prostate suite à une prostatectomie [511-513, 515, 523, 530].

Il a été également proposé d'utiliser CEP55 comme cible antigénique pour traiter le cancer du colon par immunothérapie via l'utilisation de lymphocytes T cytotoxiques reconnaissant spécifiquement la protéine CEP55 [531, 532].

Les mécanismes moléculaires expliquant le pouvoir oncogène de CEP55, qui sont très probablement différents en fonction des cancers, sont mal compris.

Dans différents cancers, il a été observé que la surexpression de CEP55 était corrélée à la sur-activation de la voie PI3K/Akt/mTOR [500, 504-506, 514]. Il a été proposé que dans des cancers du foie et du poumon la surexpression de CEP55 augmentait la migration et l'invasion cellulaire par l'activation de cette voie [504, 505].

Comme décrit précédemment, dans des cancers du poumon, VEGF-A induit une augmentation de l'expression de CEP55 de façon dose-dépendante accompagnée d'un recrutement de CEP55 sous la membrane plasmique [505]. VEGF-A est connue pour stimuler l'angiogénèse ainsi que le pouvoir métastatique d'un grand nombre de cellules tumorales [533]. Cette protéine activerait également la voie PI3K/Akt/mTOR de façon dépendante de CEP55 [505].

Par ailleurs, il a été montré que p53 régulait négativement l'expression de CEP55 en sous régulant le niveau d'expression de PLK1 [534]. Pour rappel, les phosphorylations médiées par CDK1, ERK2 et PLK1 ainsi que la transactivation par PIN1 conduisent à une augmentation de la stabilité de CEP55. L'inhibition de l'expression de PLK1 par p53 conduit donc à une diminution de la stabilité de CEP55 et à sa sous-expression.

Dans certains cancers il a été avancé que le caractère invasif et la migration des cellules dépendants de CEP55 seraient liés au facteur de transcription FOXM1 (*forkhead box protein m1*) et à une métallo-protéase de la matrice extracellulaire MMP-2 (*matrix metalloproteinase-2*). En effet, le facteur de transcription FOXM1, qui est une protéine oncogénique retrouvée dans différents cancers associés à une instabilité chromosomique [535, 536] peut favoriser l'expression de CEP55 [513, 537].

Dans des cancers à cellules squameuses du cou et de la tête CEP55 régulerait positivement le niveau d'expression de FOXM1 suggérant une boucle de rétro-action positive entre CEP55 et FOXM1 [530]. Par ailleurs, un autre gène cible de FOXM1 est la métallo-protéase de la matrice extracellulaire MMP-2. Il a ainsi été proposé que le caractère invasif et

la migration des cellules seraient dus à la surexpression de CEP55 corrélée à celle de FOXM1 qui permettrait l'expression de MMP-2 [530, 538].

Enfin, un grand nombre de partenaires protéiques connus de CEP55 sont impliqués dans des cancers, ce qui suggère qu'un changement de composition et/ou d'activité des complexes pourrait modifier l'homéostasie cellulaire et augmenter le potentiel tumoral. Parmi eux, on peut citer la protéine suppresseur de tumeurs TSG101 ou PIN1, dont l'activité est dérégulée dans un grand nombre de cancers, fait également partie de ces protéines [539].

Ainsi, CEP55 est aujourd'hui considérée comme une protéine oncogénique majeure dont l'expression est finement régulée par des suppresseurs de tumeurs et des protéines oncogéniques connues. Les rôles de CEP55 dans l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR et dans la régulation de la cytokinèse sont probablement tous les deux impliqués dans sa fonction oncogénique.

2. Nouvelles pathologies associées à CEP55

Deux articles différents parus ces derniers mois décrivent des pathologies embryonnaires létales associées à CEP55 chez l'homme [483, 540]. Ces études sont les premières montrant que le gène CEP55 qui est porté par le chromosome 10 est probablement essentiel chez l'homme.

Ces pathologies nommées respectivement MARCH [483] et le syndrome Meckel-like [540] sont associées à des mutations homozygotes dans le gène *CEP55* conduisant à une perte de fonction de *CEP55*. Ce sont des pathologies autosomales récessives. Les syndromes décrits sont très proches. Il s'agit probablement de la même maladie qui présenterait des nuances en fonction du fond génétique des patients et de la gravité de l'impact fonctionnel de la mutation sur CEP55.

Le syndrome Meckel-like a été décrit comme étant une ciliopathie c'est-à-dire une pathologie associée à un défaut de fonctionnement du cil primaire. Le cil primaire est un organelle présent à la surface d'un grand nombre de types cellulaires qui peut être impliqué dans de multiples voies cellulaires ayant un rôle dans le développement embryonnaire [540]. Il a été observé dans une famille suédoise consanguine une mutation non-sens sur CEP55

conduisant à une protéine tronquée présentant uniquement les 86 premiers acides aminés. Après séquençage de l'exome entier, il a été proposé que l'étiologie de la maladie serait une mutation homozygote sur le gène CEP55. Les parents sont chacun hétérozygote pour la mutation. Un enfant hétérozygote sain est né. Sur les trois embryons potentiellement malades, un a abouti à un avortement précoce. Les deux autres embryons homozygotes pour l'allèle mutant de CEP55 présentaient de graves malformations du cerveau telle qu'une encéphalocèle (hernie du cerveau en dehors de la boîte crânienne), une dysplasie rénale cystique (dégradation des reins couplée à la formation de kystes). Une polydactylie (présence d'un ou de plusieurs doigts ou orteils supplémentaires au niveau des mains et des pieds) a également été observée pour un embryon. La létalité est survenue entre la semaine 14 et la semaine 20 post-gestation. Une analyse histologique post-mortem a confirmé l'absence de marquage de CEP55 dans des coupes rénales de l'embryon malade comparée à un embryon contrôle.

Une équipe indépendante a décrit une maladie nommée MARCH (*multinucleated neurons, anhydramnios, renal dysplasia, cerebellar hypoplasia and hydranencephaly*) chez une famille canadienne [483].

Le premier embryon présentait des malformations du cerveau telle qu'une hydrocéphalie, une dysplasie rénale et un liquide amniotique asséché. La létalité est survenue à la 30^{ème} semaine de gestation. Deux autres enfants présentant les mêmes symptômes sont décédés pour l'un quelques minutes après l'accouchement et pour l'autre à la 32^{ème} semaine de gestation. L'examen post-mortem a révélé un grand nombre de malformations supplémentaires dont une polydactylie et une hypoplasie du cervelet (croissance insuffisante du cervelet). De plus, l'analyse histologique du cerveau révèle la présence d'un nombre anormalement élevé de neurones et de cellules gliales multinucléées (5-10%).

Après séquençage de l'exome entier des patients, deux gènes potentiellement responsables de la maladie ont été identifiés dont CEP55. La mutation homozygote sur CEP55 conduit à une protéine tronquée qui ne contient pas les 40 derniers acides aminés dont les S425, 428 et 436 (CEP55 Δ C-ter). Des fibroblastes dérivés d'un patient montre que le niveau d'expression de CEP55 est légèrement diminué comparé à des fibroblastes contrôles.

Pour comprendre plus en détail le rôle de cette protéine tronquée les auteurs ont utilisé comme organisme modèle le poisson zèbre. Ils ont d'abord pu observer, comme dans l'étude décrite précédemment chez le poisson zèbre, des symptômes proches de ce qui est observé chez les patients, à savoir des malformations du cerveau et une dysplasie rénale après

l'injection de morpholinos dirigés contre CEP55. Ils ont également observé une apoptose massive des cellules. Ces défauts sont restaurés par l'injection d'un ARNm codant pour CEP55 WT. Pour vérifier la spécificité des morpholinos utilisés, les auteurs ont adopté une approche CRISPR/Cas9 afin d'invalider le gène *CEP55* et ils ont observé les mêmes symptômes. Dans ces embryons de poisson zèbre invalidés pour CEP55, une restauration phénotypique significative a été mise évidence par des ARNm codant pour la protéine WT et non pour la protéine CEP55 (Δ C-ter). Les auteurs ont également observé dans des cellules COS-7(*CV-1 in origin with SV40 genes 7*) que la protéine CEP55 (Δ C-ter) présentait un défaut de localisation total au midbody montrant que les 40 derniers acides aminés de CEP55 sont nécessaires pour son recrutement au midbody.

Globalement les auteurs ont émis l'hypothèse que la cause probable de la maladie était la mutation homozygote sur CEP55 conduisant à l'expression d'une protéine CEP55 non-fonctionnelle, incapable de se localiser au midbody et créant ainsi des défauts d'abscission durant le développement embryonnaire.

Ils ont également proposé que la protéine tronquée CEP55 puisse être altérée dans sa capacité à réguler la voie PI3K/akt. En effet, aucune restauration phénotypique n'a été observée pour le mutant CEP55 (Δ C-ter) chez le poisson zèbre. Or comme nous l'avons vu précédemment, l'invalidation de CEP55 conduit à une forte inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR qui est importante pour le développement embryonnaire chez le poisson zèbre [507].

Dans cette étude, les auteurs n'ont pas fait de lien avec une ciliopathie bien que les symptômes observés puissent se rapprocher de ceux décrits dans le syndrome Meckel-like.

Chapitre 3 : problématique de la thèse

Mon laboratoire d'accueil a étudié pendant de nombreuses années le rôle des chaînes de poly-ubiquitine non-dégradatives dans la voie NF- κ B et plus particulièrement l'impact fonctionnel de la protéine NEMO dans l'activation de cette voie de signalisation. NEMO qui a été découverte dans le laboratoire d'A. Israël y joue un rôle déterminant en interagissant avec les chaînes M1 par son domaine NOA et avec les chaînes K63 par son domaine bipartite NOAZ (NOA+ZF). Contrairement à la voie NF- κ B dans laquelle les fonctions de l'ubiquitine ont été étudiées depuis plus d'une quinzaine d'années, quasiment rien n'est connu sur le rôle de l'ubiquitine dans les phases tardives de la cytokinèse malgré une accumulation des acteurs du système de l'ubiquitine au niveau du pont intercellulaire et du midbody.

Des études bioinformatiques structurales menées au laboratoire ont suggéré que CEP55 présentait, en plus d'une architecture globale similaire à celle de NEMO, un domaine récepteur à l'ubiquitine bipartite (NOAZ).

Durant ma thèse, j'ai d'abord cherché à montrer par des approches de modélisation structurale, de biochimie et de biophysique que CEP55 présentait effectivement un domaine NOA ainsi qu'un domaine ZF capable d'interagir avec des chaînes d'ubiquitine. Je me suis ensuite intéressé, en utilisant des approches de biochimie, de génétique et de biologie cellulaire, au rôle fonctionnel de ces UBDs dans les fonctions portées par CEP55 durant la cytokinèse et dans la dégradation des midbody.

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressé au domaine NOAZ de CEP55 et j'ai cherché à montrer si les deux UBDs de CEP55 pouvaient interagir de façon coopérative afin de reconnaître de longues chaînes d'ubiquitine K63 comme ce qui a été observé pour le domaine NOAZ de NEMO. Par ailleurs, la région PRR de CEP55 séparant les deux domaines NOA et ZF a été décrite comme étant phosphorylée et isomérisée par les enzymes ERK2 et PIN1. J'ai cherché à comprendre si ces modifications pouvaient moduler les propriétés de coopérativité des deux domaines pour interagir avec de longues chaînes d'ubiquitine K63 *in vitro*.

Les résultats obtenus ont conduit à initier une campagne de criblage au sein de la Plateforme de criblage chémogénomique et biologique (PF-CCB) visant à déterminer les

enzymes du système de l'ubiquitine qui sont impliquées dans la cytokinèse et dans la fonction portée par CEP55 dans ce processus. Les potentiels candidats obtenus seront discutés.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Purification des protéines His-strep CEP55 sauvage et du mutant C440A/C443A à partir de cellules humaines

Les productions de cellules 293 "freestyle" transfectées transitoirement avec des vecteurs d'expression d'eucaryote pcDNA3.1 (Invitrogen) codant pour les protéines sauvages et mutantes His-strep CEP55 ont été effectuées en collaboration avec la plateforme de Protéines Recombinantes de l'Institut Pasteur dirigée par Stéphane Pêtres. Les cellules 293 « FreeStyle » ont été cultivées en suspension dans du milieu FreeStyle™ 293 (Gibco^R) dans un incubateur contenant 5% de dioxyde de carbone. $2,5 \times 10^9$ cellules ont été transfectées avec 1 mg de plasmides pcDNA3.1 codant soit pour la protéine His-strep CEP55 sauvage soit la forme mutante His-strep CEP55 C440A/C443A en utilisant l'agent de transfection PEIpro^R (Polyplus, France) en accord avec les préconisations du fournisseur.

$2,4 \times 10^9$ cellules ont été lysées 72 h post-transfection dans le tampon de lyse 50 mM Tris-HCl à pH 8,0 contenant, 0,1 mM Tris (2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), 1 % Triton X100, 15% Glycérol, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 40 u/ml de Benzonase (Novagen) et une pastille d'inhibiteurs de protéase "EDTA-free" (Roche) pendant 30 min à température ambiante. Après centrifugation à 15000 x g pendant 15 min à 4 °C, les culots sont lavés deux fois dans un tampon de lavage 50 mM Tris-HCl à pH 8,0 contenant, 0,1 mM TCEP, 500 mM NaCl, 0,5 mM de détergent dodecyl maltoside (DDM) et des inhibiteurs de protéase "EDTA-free" (Roche), avant d'être solubilisés dans un tampon dénaturant contenant 8 M urée 50 mM Tris -HCl à pH 8,0, 0,1 mM TCEP, 1M NaCl et 10 mM imidazole. Le lysat clarifié et dénaturé a ensuite été dilué d'un facteur 3 avec le tampon de solubilisation exempt d'urée avant d'être incubé avec des billes Ni-NTA superflow (Qiagen) durant la nuit à température ambiante et sous agitation rotative. Les billes ont été lavées successivement avec le tampon urée puis incubées dans le tampon de renaturation 50 mM Tris-HCl à pH 8,0 contenant, 10 mM imidazole, 0,1 mM, TCEP et 1 M NaCl, durant la nuit à 4 °C. Après un lavage exhaustif des billes Ni-NTA par 6 volumes de tampon de renaturation, les protéines immobilisées sur les billes ont ensuite été incubées dans un tampon 50 mM Tris-HCl à pH 8,0 contenant 0,2 mM TCEP, 500 mM NaCl et 50 % glycérol, puis conservées à -20 °C.

Western-blot et expériences de "Pull-down Ni-NTA"

Les cellules HeLa S3 ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles décrites dans la section "Experimental Procedures" de l'article (Chapitre 1). 250×10^6 cellules HeLa S3 ont été lysées dans le tampon 50 mM Tris-HCl à pH 7,5 contenant 1% Triton X100, 1 mM

DTT, 50 mM NaCl et 10 % Glycérol. Des inhibiteurs de phosphatase (Phos-stop, Roche), de protéase (EDTA-Free, Roche) et l'inhibiteur PR-619 (Sigma, 5 μ M) de déubiquitine ont été ajoutés au tampon de lyse puis le lysat total a été incubé sous agitation rotative pendant 1 h à 4 °C. Le lysat cellulaire a ensuite été centrifugé à 15000 x g pendant 15 min à 4 °C. Les billes Ni-NTa seules ou contenant 20 μ g de protéines His-strep CEP55 sauvage ou mutante His-strep CEP55 C440A/C443A (quantifiées d'après l'analyse par SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie), préalablement équilibrées dans le tampon de lyse, ont ensuite été incubées avec l'extrait brut (chacun correspondant à 12 x 10⁶ cellules) durant la nuit sous agitation à 4 °C. Les billes ont été ensuite lavées dans le tampon de lyse avant d'être resuspendues dans le tampon de charge pour gel SDS (Sample buffer, Bio-Rad), bouillies pendant 10 min à 100 °C, puis soumises à une analyse de Western blot comme décrit dans la section "Experimental Procedures" de l'article (Chapitre 1).

Caractérisation phénotypique de la lignée U20S (CEP55 K.O) invalidée pour le gène CEP55

15 000 cellules ont été distribuées dans une microplaque de 24 puits puis fixées par du méthanol 48 h post ensemencement avant d'être soumises à une analyse de microscopie à immunofluorescence comme décrit dans la section "Experimental Procedures" de l'article (Chapitre 1). Les expériences ont été répétées 5 fois et le test non-paramétrique Kruskal-Wallis a été utilisé pour l'analyse statistique. *: p < 0,05; **: p < 0,01

Plasmides utilisés

Le plasmide pGEX-4T-1 (GE healthcare life sciences) codant pour la protéine humaine GST-NOAZ a été construit par E. Laplantine du laboratoire de R. Weil. Le plasmide pET28 codant pour la protéine humaine His-NOAZ a été généré par GeneART (ThermoFisher scientific, MA USA) en synthétisant le gène par PCR d'assemblage et en optimisant les codons pour l'expression de la protéine chez *E.coli*.

Expression et purification des protéines GST-NOAZ et His-NOAZ

Les bactéries chimio-compétentes *E.coli* BL21 (50 μ l) ont été incubées avec 100 ng de plasmide pGEX-4T-1 et pET28 codant respectivement pour les protéines GST-NOAZ et His-NOAZ pendant 30 min dans la glace, puis ont subi un choc thermique pendant 42 secondes à

42 °C. Les bactéries transformées ont été ensuite incubées dans 500 µL de milieu Luria Bertani (LB : Bactotryptone 10 g/l, extrait de levure 5 g/l, NaCl 10 g/l, 950 ml eau distillée) sous agitation pendant 1h à 37 °C, étalées sur gélose en présence d'ampicilline (50 µg/ml) et de kanamycine (50 µg/ml) respectivement, avant d'être incubées toute la nuit à 37 °C.

Des colonies isolées contenant les plasmides pGEX-4T-1 et pET28 ont été ensemencées dans 2 L de milieu LB en présence d'ampicilline (50 µg/ml) ou de kanamycine (50 µg/ml), respectivement. L'induction à l'IPTG (1mM) a été réalisée lorsque l'absorbance de la culture a atteint 0,5 u.D.O/ml pendant 4 h à 25 °C pour les bactéries transformées avec le plasmide pGEX-4T-1 et à 37 °C et pour les bactéries transformées avec le plasmide pET28.

Toutes les purifications ont été effectuées à température ambiante à l'aide d'un appareil ÄKTA Prime Purifier (Biotech GE healthcare life sciences). La protéine GST-NOAZ a été purifiée à partir de la fraction insoluble issue d'extraits bruts bactériens. Après une lyse mécanique des bactéries à la french-press, la fraction insoluble a été extensivement lavée dans un tampon 50 mM Tris-HCl à pH 8,0, contenant 300 mM NaCl, 3 %, triton X 100 et 0,1 mM TCEP puis solubilisée dans ce même tampon contenant le détergent Sarkosyl 10 %. Le culot resuspendu a ensuite été dilué 5 fois par ajout goutte à goutte sous agitation du tampon de lyse mais contenant cette fois 30 mM CHAPS et 3 % Triton X100 pour diminuer la concentration en sarkosyl. La suspension a été ensuite centrifugée à 10 000 x g pendant 15 min et le surnageant a été appliqué sur une colonne d'affinité de glutathion-Sepahrose (GE Healthcare life sciences). La colonne a été ensuite abondamment lavée avec du tampon 50 mM Tris-HCl à pH 8,0 contenant 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP, 20 mM CHAPS et 2 % Triton X100, avant d'être soumise à un second tampon de lavage (Tampon L2) contenant 0,5 mM DDM afin de favoriser l'élimination des détergents de micelle (sarkosyl, triton x100 et CHAPS). L'élution a été réalisée en une seule étape avec le tampon L2 contenant 15 mM de glutathion réduit. Les fractions correspondant à la protéine d'intérêt ont été ensuite analysées par SDS-PAGE puis rassemblées avant d'être soumises à une dialyse extensive contre du tampon L2. La protéine a ensuite été aliquotée dans des tubes « eppendorf » stériles puis conservée à 4 °C pour éviter la congélation et minimiser la formation d'agrégats protéiques.

La protéine His-NOAZ a été purifiée selon un protocole de purification similaire à celui des protéines His-NOA sauvage et mutante de CEP55 qui est décrit dans la section "Experimental Procedures" de l'article (Chapitre 1).

Test d'interaction à l'ubiquitine par interférométrie sur bio-couche (BLI) :

Les mêmes conditions expérimentales que celles décrites dans l'article ont été utilisées.

La protéine His-NOAZ (2 μ M) a été immobilisée sur des biosenseurs Anti-Penta-HIS (fortebio, Pall life sciences) dans un tampon 50 mM Tris-HCl à pH 7,5 contenant 150 mM NaCl et 0.2 mM TCEP. Différentes concentrations de tétra-ubiquitine K63 (5 - 2,5 μ M) et M1 (5 - 2,5 μ M) ont été utilisées et les constantes cinétiques d'association k_{on} et de dissociation k_{off} ont été déterminées en ajustant les courbes expérimentales par régression non linéaire en utilisant une équation de modèle d'interaction à un seul site (cf. "Experimental Procedures" de l'article dans le chapitre 1)

Phosphorylation de la protéine GST-NOAZ et traitement par la Lambda-Phosphatase

5 μ g de protéine GST-NOAZ ont été incubés pendant 2 h 30 à 30°C sous agitation constante en présence ou en absence de 0,3 μ g de la protéine GST-ERK2 (E1283, Sigma-Aldrich) dans le tampon de phosphorylation suivant : 5 mM MOPS à pH 7,2 contenant 2,5 mM de l'inhibiteur de phosphatase Glycérol-2-P, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,4 mM d'EDTA, 0,25 mM de Dithiothreitol (DTT) et 2 mM d'ATP. Les mélanges réactionnels ont été ensuite incubés avec des billes de glutathion magnétiques (88821, Pierce) pendant 45 min à 30 °C et les billes ont été séparées en 2 lots puis tassées par aimantation. Les deux lots de billes ont été ensuite incubés pendant 1 h à 30 °C dans le tampon de déphosphorylation 50 mM HEPES à pH 7,5 contenant 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,01 %, Brij 35 en présence ou non de Lambda-Phosphatase (40000 u/ml) (P0753S, New England Biolabs). Les billes ont par la suite été lavées dans le tampon de déphosphorylation et la protéine GST-NOAZ a été éluée par incubation avec le tampon de charge SDS-PAGE contenant du SDS (Sample buffer 1X, Biorad) pendant 10 min à 100 °C, avant d'être analysée par SDS-PAGE puis colorée au bleu de Coomassie.

Expériences de "Pull down" de la protéine GST-NOAZ avec des chaînes de poly-ubiquitine K63 après phosphorylation et isomérisation:

Dans le cas des expériences avec les différentes chaînes de polyubiquitine K63 (Ub₃, Ub₄ et Ub₅), 5 μ g de GST-NOAZ ont été incubés pendant 2 h 30 à 30 °C sous agitation constante avec la protéine GST-ERK (0,3 μ g) dans le tampon de phosphorylation suivant : 5 mM de MOPS à pH 7,2 contenant 2,5 mM de Glycérol-2-P, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0,4

mM EDTA, 0,25 mM DTT, en présence ou en absence d'ATP (2 mM) et de Pin1 (0,9 µg) (Origene, TP302543).

Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 45 min à 30 °C avec des billes de glutathion magnétiques. Les billes ont ensuite été lavées abondamment dans le tampon d'interaction 50 mM Tris-HCl à pH 8 contenant 150 mM NaCl, 0,2 mM DDM, 0,1 mM TCEP et 20 % Glycérol avant d'être incubées en présence d'Ub₃, Ub₄ ou Ub₅ K63 (15 µM) pendant 1 h à 4 °C. Les billes ont été par la suite lavées dans le tampon d'interaction et les protéines immobilisées sur les billes ont été éluées à l'aide du tampon de charge SDS-PAGE classique contenant du SDS (sample buffer 1x, Biorad). Les échantillons ont ensuite été bouillis 10 min à 100 °C, analysés par SDS-PAGE, puis les protéines ont été révélées au bleu de Coomassie.

Analyse par spectrométrie de masse de la forme phosphorylée de la protéine GST-NOAZ par ERK2

L'étude des sites de phosphorylation de la protéine GST-NOAZ par spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec Thibault Chaze de l'Unité de Spectrométrie de Masse Structurale et Protéomique de l'Institut Pasteur dirigée par Julia Chamot-Rooke. La protéine GST-NOAZ a été phosphorylée de la même façon que décrit précédemment, révélée au bleu de Coomassie puis découpée du gel humide pour être soumise à une analyse par l'Unité de Spectrométrie de Masse Structurale et Protéomique de l'Institut Pasteur. L'échantillon a ensuite été incubé dans un tampon contenant de la trypsine, puis le mélange de peptides tryptiques a été analysé par chromatographie liquide en phase inverse couplée à une analyse en tandem MS/MS. Les peptides élués selon leur temps de rétention vis-à-vis d'un gradient linéaire d'acétonitrile sont ensuite soumis à une première analyse en spectrométrie de masse et confrontés à leur masse théorique. Sur un taux de recouvrement de la protéine GST-NOAZ de 71%, un seul peptide présentait une différence de masse de 98 Da correspondant idéalement à l'ajout d'un phosphate. Le peptide phosphorylé a été confirmé par fragmentation HCD (higher energy collisional dissociation) à l'aide d'un spectromètre de masse Orbitrap Q-Exactive (ThermoFisher Scientific). La position du résidu modifié au sein du peptide phosphorylé a été déterminée par fragmentation ETD (electron transfer dissociation) et a permis d'identifier le résidu Ser 428 comme étant l'unique acide aminé phosphorylé par la kinase ERK2. Le spectrogramme de cette dernière expérience est indiqué dans la figure 60 du chapitre 2.

Analyse de la forme oligomérique de la protéine His-NOAZ par diffusion de lumière statique à Multi-Angles

Le protocole d'analyse de la protéine His-NOAZ est similaire à celui de la protéine His-NOA qui est décrit dans la section "Experimental Procedures" de l'article présenté dans le chapitre 1 des résultats.

RÉSULTATS

Chapitre 1 : CEP55 contient deux domaines d'interaction à l'ubiquitine similaires à ceux de NEMO qui sont impliqués dans la cytokinèse

I) PRÉAMBULE

Dans ce chapitre qui est présenté majoritairement en anglais sous la forme d'un article scientifique, j'aborde les principaux résultats obtenus au cours de ma thèse. Ce travail est issu de la contribution active des membres et d'anciens membres du laboratoire, E. Fontan, L. Davignon, A. Boucharlat, M. Charpentier, F. Agou ainsi que d'E. Laplantine qui appartient au laboratoire de Signalisation et Pathogénèse dirigé par R.Weil.

Nous montrons que CEP55 (Centrosomal protein 55) présente deux domaines d'interaction à l'ubiquitine (UBD) similaires à NEMO (NF- κ B essential modulator), un domaine NOA ainsi qu'un domaine ZF de type UBZ qui interagissent spécifiquement avec des chaînes de poly-ubiquitine *in vitro*. De plus, nous mettons en évidence que les deux UBDs NOA et ZF sont importants dans la fonction portée par CEP55 au cours de la cytokinèse. Nos résultats révèlent que le domaine NOA n'est pas impliqué dans le recrutement de CEP55 au midbody et joue ainsi un rôle fonctionnel en aval de celui-ci. Par ailleurs, nous montrons que le domaine ZF de CEP55 forme un nouveau domaine d'adressage au midbody requis pour le bon déroulement de la cytokinèse. Ce recrutement de CEP55 au midbody est dépendant de l'interaction du domaine ZF de CEP55 avec l'ubiquitine comme montré par des expériences *in cellula*.

Le projet a été initié sur la base des alignements de séquences et de structures entre la protéine CEP55 et la protéine NEMO suggérant la présence de deux domaines d'interaction à

l'ubiquitine similaires chez CEP55 et NEMO. L'idée était alors d'utiliser l'expertise acquise pendant de nombreuses années sur les propriétés biochimiques et structurales de la protéine NEMO afin de caractériser la protéine CEP55 *in vitro* et *in cellula*.

Il s'est avéré au cours de ma thèse que la protéine CEP55 présente de fortes propriétés d'insolubilité et il nous a d'abord été difficile de purifier la protéine entière. En effet, des expériences préliminaires avaient suggéré que la protéine n'était pas exprimée dans les cellules embryonnaires de reins humains 293T. Toutefois, une analyse plus fine des lysats cellulaires issus des cellules 293T qui ont été transfectées transitoirement avec un plasmide codant pour la protéine CEP55 a permis de mettre en évidence, des années plus tard, que la protéine était fortement exprimée mais principalement dans la fraction insoluble des lysats cellulaires (cf. la section « Commentaire » du chapitre 1).

Ceci nous a amené à travailler sur des domaines isolés afin de faciliter la caractérisation des domaines NOA et ZF *in vitro*. Les précédents résultats obtenus sur la caractérisation du domaine ZF de NEMO avaient montré que l'utilisation d'un peptide synthétique mimant le domaine ZF était une approche efficace afin de caractériser les domaines ZF d'interaction à l'ubiquitine de type UBZ [145, 146]. En effet, le peptide ZF se replie correctement de manière autonome en présence de zinc et forme une structure similaire à celle du ZF natif dans la protéine. Concernant le domaine NOA, nous avons observé que la protéine était exprimée (avec une étiquette 6xHis ou une protéine de fusion GST) dans la fraction insoluble chez *E. Coli*. Nous avons tiré parti de l'expérience acquise au laboratoire sur le domaine « coiled-coil » NOA de NEMO et de façon plus générale sur les domaines « coiled-coil » pour mettre rapidement en place un protocole de dénaturation/renaturation à partir des corps d'inclusion. Cette étape a été grandement facilitée par le fait que les domaines de type « coiled-coil » se replient généralement correctement après une simple dénaturation en présence d'agents dénaturants [147].

A mon arrivée au laboratoire, aucune structure cristallographique ou de RMN de domaines UBZ n'avait été publiée. Les seules informations structurales d'une interaction d'un UBZ avec l'ubiquitine résultaient de deux modèles bâtis à partir de données de RMN et de mutagenèse dirigée des domaines ZF de la DNA polymérase Pol η et de NEMO [145, 187]. Quelques temps après, la première structure cristalline d'un complexe entre un domaine UBZ et l'ubiquitine a été résolue et déposée dans la PDB, bien que l'article la décrivant n'ait été publié que des années plus tard [169]. Il s'agissait du domaine UBZ de la protéine Werner interacting protein 1 (WRNIP-1) en interaction avec la mono-ubiquitine. Toutefois, les

auteurs avaient dû fusionner le domaine UBZ de WRNIP-1 avec la protéine GFP pour obtenir des cristaux avec un pouvoir de diffraction élevé. Par conséquent, on ne pouvait pas exclure une hypothétique interférence de la GFP sur le mode d'interaction entre un domaine UBZ et la mono-ubiquitine. Malgré tout, la présence de résidus conservés dans l'interaction avec l'ubiquitine entre CEP55 et WRNIP-1, et notamment la présence d'un résidu acide strictement conservé (E460 chez CEP55), a permis de renforcer l'hypothèse selon laquelle le ZF de CEP55 forme un UBZ. De plus, des expériences préliminaires de biologie cellulaire suggéraient un rôle important du domaine ZF dans la cytocinèse.

Concernant le domaine NOA, l'analyse plus exhaustive des alignements de séquence et de structure ont tout d'abord révélé au début de ma thèse un niveau de conservation plus faible du domaine NOA chez CEP55 comparé à celui du ZF. Nous avons en effet observé que certains résidus importants dans l'interaction entre le domaine NOA de NEMO et les di-ubiquitines (M1 et K63) n'étaient pas conservés chez CEP55. De plus, un double mutant D362R/F363P du domaine NOA avait été généré et nos expériences préliminaires montraient que ce double mutant n'induisait pas de défaut important de cytocinèse dans des cellules HeLa. Malgré cela, nous avons persévéré et cherché à augmenter la fenêtre de sensibilité de notre test de complémentation fonctionnelle dans les cellules HeLa. En parallèle, nous avons entrepris la caractérisation de mutants d'interaction à l'ubiquitine du domaine NOA *in vitro*.

De manière intéressante, la structure cristallographique d'un nouveau complexe entre le domaine NOA de la protéine ABIN 2 et une tri-ubiquitine linéaire, déposée récemment dans la PDB, a révélé la présence de résidus d'interaction à l'ubiquitine spécifiques à ABIN2 qui sont conservés chez CEP55 mais absents dans les domaines NOAs de NEMO et OPTINEURIN (aussi appelée NRP). Ceci a permis de renforcer l'hypothèse selon laquelle CEP55 contient un domaine NOA et validé d'autant plus notre modèle structural du domaine NOA de CEP55.

Finalement, un article a été publié cette année décrivant une pathologie létale embryonnaire humaine associée à l'expression d'une forme tronquée de CEP55 ne contenant pas les 40 acides aminés c-terminaux contenant le domaine ZF. Les présents résultats décrits dans ce premier chapitre de ma thèse permettent pour la première fois d'apporter une base moléculaire rendant compte des manifestations cliniques liées aux défauts de cytocinèse qui ont été observés dans ces embryons de patients. J'aborderai de manière plus exhaustive ces aspects dans la partie discussion de ma thèse.

II) ARTICLE EN PRÉPARATION

**CEP55 contains two novel NEMO-like ubiquitin binding domains,
which play different roles in cytokinetic abscission**

Keïs Nabhane Said Halidi¹, Elisabeth Fontan¹, Alix Boucharlat¹, Laurianne Davignon¹,
Marine Charpentier¹, Robert Weil², Alain Israël³, Emmanuel Laplantine^{2*} and Fabrice Agou^{1*}

¹PlateForme de Criblage Chemogénomique et Biologique, Citech, Départements de Biologie Cellulaire et Infection et de Biologie Structurale et Chimie, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724, Paris CEDEX 15

²Laboratoire de Signalisation et Pathogénèse, Département de Biologie Cellulaire et Infection, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724, Paris CEDEX 15

³Unité de Signalisation Moléculaire et Activation Cellulaire, Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique URA 2582, Paris 75015, France

*Emmanuel Laplantine and Fabrice Agou are co-senior authors

Correspondence:

fabrice.agou@pasteur.fr; Ph: +33 (1) 44 38 95 69
emmanuel.laplantine.fr; Ph: +33 (1) 40 61 30 39

SUMMARY

The CEP55 protein (Centrosomal protein 55 kDa) critically regulates the final step of cell division termed cytokinetic abscission. Even though the importance of ubiquitin signaling has been previously described in abscission, its precise role is still unknown. We report herein that CEP55 contains two NEMO-like ubiquitin binding domains (UBDs), called NOA and ZF, which regulate its function in a different manner. *In vitro* studies of isolated domains showed that NOA adopts a dimeric coiled-coil structure, while ZF is based on a UBZ scaffold. Quantitative binding studies pointed out that NOA selectively binds to M1 poly-ubiquitin chains, whilst ZF does not discriminate between non-degradative M1 and K63 chains. Based on structural modeling, we generated mutants either of NOA or ZF domains unable to bind to ubiquitin. Interestingly, CEP55 knock-downed HeLa cells reconstituted with the full-length CEP55 ubiquitin binding defective mutants - containing mutations either in NOA^{CEP55} or ZF^{CEP55} domains – display severe abscission defects. Furthermore, while NOA mutants were normally recruited to the midbody, all ZF ubiquitin binding mutants were not, suggesting that ZF^{CEP55} also exhibits a cargo receptor activity to the midbody. Indeed, we showed that GFP-ZF^{CEP55} is specifically recruited to the midbody. In addition, this cargo receptor activity can be replaced by ZF-based UBDs belonging to the UBZ family, indicating that the essential, if not unique, function of ZF^{CEP55} is to act as ubiquitin receptor. Our work sheds light on an unexpected role of CEP55 in non-degradative ubiquitin signaling during cytokinetic abscission.

HIGHLIGHTS

- CEP55 forms a novel NEMO-related protein with two NOA and UBZ domains, which are crucial for the CEP55 function in cytokinetic abscission
- CEP55 NOA and UBZ act differently on the CEP55 function in cytokinesis
- CEP55 UBZ functions as the first cargo receptor to the midbody and depends on its ability to bind non-degradative linear and K63 ubiquitin chains

INTRODUCTION

In animal cells, cytokinesis leads to cytoplasm separation of the daughter cells, and defects during this process can lead to polyploidy and aneuploidy, situations which are frequently observed in cancers [541]. Cytokinesis begins in anaphase with the formation of an actomyosin ring, which constricts the plasma membrane of the cells finally leading to the formation of an intercellular bridge [286]. The future daughter cells are connected by this intercellular bridge during several hours before being individualized by a process termed abscission, which generally occurs in the G1 phase [344]. At the center of the intercellular bridge, the midbody, a crucial component of the abscission process, plays a role of recruitment platform for abscission and acts as a stabilizer of the intercellular bridge [286]. After abscission, the midbody remnant (MR) is asymmetrically inherited by one of the two daughter cells and finally degraded by autophagic or non-autophagic lysosomal pathways [467, 542].

Centrosomal protein 55 kDa (CEP55), a key regulator of cytokinetic abscission, is predominantly a α -helical coiled-coil protein, which is able to oligomerize [356, 402, 443, 481]. CEP55 is essential for the recruitment of the Endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery to the intercellular bridge [357, 402, 443, 444]. CEP55 directly interacts with ALG-2 interacting protein X (ALIX) and the ESCRT-I Tumor susceptibility gene 101 (TGS101) via its atypical α -helical coiled coil dimeric region called EABR (ESCRT-and ALIX-binding region), allowing ALIX and TGS101 recruitment to the midbody. CEP55 also has a central role in the midbody integrity maintenance [356] and in the MR degradation [466, 469].

CEP55 is recruited to the midbody in late mitosis [482]. This recruitment depends on the Mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1), a Centralspindlin component, which has been shown to co-immuno-precipitate with CEP55 under endogenous conditions as well as in reticulocyte lysates after *in vitro* transcription/translation of both proteins [356, 482]. It has been reported that CEP55 become phosphorylated during mitosis on its S425 and S428 residues by Cyclin dependent kinase 1 (Cdk1) and Extracellular signal-regulated kinase 2 (Erk2), while its S436 residue is phosphorylated by Polo-like kinase 1 (PLK1) [481, 482]. The PLK1 phosphorylation prevents CEP55 early recruitment to the mitotic spindle and its accumulation to the midbody, which leads to severe abscission defects and an inhibition of the ESCRT machinery recruitment to the midbody [482, 490]. It has been proposed that PLK1 could indirectly interact with CEP55 via the formation of a quaternary complex, which

involves Myotubularin-related proteins 3 (MTMR3) and MTMR4 [491]. Both of these myotubularins were shown to be important in the abscission process regulating CEP55 recruitment to the midbody [491]. Importantly, a severe human embryonic pathology called MARCH (multinucleated neurons, anhydramnios, renal dysplasia, cerebellar hypoplasia and hydranencephaly) was recently associated with a deletion of the last 40 amino acids in CEP55, leading to a severe defect of CEP55 recruitment to the midbody [483].

The post-translational modification of proteins by mono-ubiquitin or poly-ubiquitin chains of variable length and/or different linkage types is involved in a vast range of cellular processes including autophagy, DNA repair, protein turnover and NF- κ B signaling pathway [198]. These chains are specifically recognized by ubiquitin binding domains (UBDs), which have been described in a large number of effector proteins as able to translate the modifications into specific outcomes. In the NF- κ B cascade, NEMO (NF- κ B Essential Modulator) contains two UBDs, which non-covalently bind to hybrid M1/K63 poly-ubiquitin chains to trigger the NF- κ B activation [247]. The first NEMO UBD referred to as NOA/UBAN domain (also called NUB or CC2-LZ) forms a long parallel α -helical coiled-coil dimer, which selectively binds to a Methionine 1 (M1) di-ubiquitin chain [76]. The second UBD is a classical CCHC-type zinc finger (ZF), which adopts a $\beta\beta\alpha$ fold and interacts with a weak preference to lysine 63 (K63) and M1 over Lysine 48 (K48) poly-ubiquitin chains [145, 146].

During cytokinesis, the E2/E3 ubiquitin ligase Bruce (BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme), the deubiquitinases USP8 (Ubiquitin specific peptidase 8) as well as AMSH (Associated molecule with the SH3-domain of STAM) were reported to be located to the midbody and play key roles in the cytokinetic abscission process [452] [442]. However, despite an accumulation of mono-ubiquitin and different type of poly-ubiquitin chains at the midbody and intercellular bridge, little is known about the role of ubiquitin signaling during the abscission process [99, 442, 452].

Here, we show that CEP55 is a new ubiquitin binding receptor sharing with NEMO two UBDs namely NOA and ZF, which differently regulate CEP55 functions. Both domains bind to poly-ubiquitin chains *in vitro*, but while NOA is specifically involved in the abscission process we showed that ZF is critical for CEP55 recruitment to the midbody and is therefore crucial in CEP55 functions at the midbody.

RESULTS

CEP55 contains two ubiquitin binding domains (UBDs), which are structurally similar to NOA and ZF UBDs of NEMO

The NEMO (NF- κ B Essential modulator) function depends on two ubiquitin binding domain (UBD) in its C-terminal part, referred to NOA/UBAN domain (also called NUB or CC2-LZ, [136, 139] and ZF domain [145, 146]. The NOA domain forms a long parallel α -helical coiled-coil dimer [76], while the ZF domain exhibits an UBZ architecture based on a classic $\beta\beta\alpha$ fold [145]. Multiple sequence alignment analyze in protein sequence database, combined with the Paircoil2 algorithm, predicts that the CEP55 protein contains in its C-terminal part two UBDs, referred as NOA (residues 304-396) and ZF (residues 435-464) respectively, owing to their significant homologies with those of NEMO (**Figures 1A, S1A and S1B**). To test this hypothesis, we first expressed in *E. coli* and purified to homogeneity a His-tag version of the human CEP55 NOA fragment (residues 304-396) (**Figure 1B inset**). Circular dichroism spectrum in far UV showed that CEP55 His-NOA exhibits a high α -helical content of 80%, compatible with a α -helical coiled-coil structure (**Figure 1B**). To non-ambiguously determine the oligomeric state of CEP55 His-NOA in solution, we performed size exclusion chromatography experiments coupled in line with multi-angle light scattering (SEC-MALS), and showed that CEP55 His-NOA mainly behaves as monomers and dimers, with a very little amount of higher order oligomers (hexamer 1%, **Figure 1C**). Based on these biochemical experiments, we generated a structural model of the NOA^{CEP55} using NOA^{NEMO} as structural template (**Figure S1C**), and observed that the C359 residue of one monomer is in close proximity with the C359 residue of second monomer, when NOA^{CEP55} forms a α -helical coiled-coil dimer (**Figure S2A**). We utilized this ability of the CEP55 His-NOA construct to form an intermolecular disulfide bond at C359 to further confirm its dimeric state. As shown in **Figure S2B**, CEP55 His-NOA migrated at the dimeric molecular mass in the absence of the reducing agent dithioerythritol (DTE), while it migrated at the monomeric molecular mass upon treatment with DTE, further confirming that CEP55 His-NOA likely forms a long parallel α -helical coiled-coil dimer like that of NEMO. However, this isolated NOA^{CEP55} domain appears to exhibit a much weaker dimerization affinity than that of NEMO NOA, which was previously shown to have a dimerization constant around 30 μ M [543].

To investigate whether the human CEP55 fragment containing the residues 435-464 adopts a zinc finger folding, we generated a synthetic peptide mimicking this region and containing the V438W substitution (CEP55 ZF (W)). This substitution was previously

described to act as a sensitive probe to monitor zinc-induced folding of the NEMO ZF without interfering with its overall structure [145]. We recorded fluorescence emission spectrum of the CEP55 ZF (W) peptide at 300-450 nm using an excitation wavelength of 280 nm, allowing us to specifically irradiate the two tyrosines (Y447 and Y461) and tryptophan (W438) residues (**Figure 1D**). Upon zinc addition, CEP55 ZF (W) exhibits an increase of the fluorescence signal with a 7 nm blue shift of the tryptophan emission maximum (353-342nm). Concomitantly, it leads to a decrease of the minor shoulder at (300-310nm), which usually corresponds to fluorescence emission spectra of tyrosine residues. This clearly indicated that an internal FRET from tyrosines to tryptophan occurs only after the addition of zinc. The internal FRET efficiencies from Y to W were then determined in the presence and absence of zinc and a 1.9 ± 0.06 fold increase was observed upon zinc addition (**Table 1**). Because internal FRET efficiency is highly sensitive to the distance between the acceptor and the donor, these data clearly indicated that zinc induces a spatial confinement of the two Y447 and Y461 to W438, reflecting a proper folding of the domain as a zinc finger. We took advantage of this zinc-dependent fluorescence signal at 342 nm to titrate CEP55 ZF (W) by zinc ion (**Figure 1E**). A strong binding affinity of 20 nM was observed with a binding stoichiometry of 1:1. This binding stoichiometry was further confirmed using a colorimetric assay as described in experimental procedures. Altogether, these data combined with multiple sequence alignment (**Figure S4**) showed that the CEP55 fragment containing the residues 435-464 forms a CCHC type ZF structure, which is likely to be built on a $\beta\beta\alpha$ fold. In a similar way to NOA^{CEP55}, a structural model of ZF^{CEP55} was generated using NEMO ZF as template, emphasizing the four residues (C440, C443, H458 and C462) which tetra-coordinate the zinc atom (**Figure S1D**) and which are strictly conserved amongst all CEP55 orthologues (**Figure S1A**).

NOA^{CEP55} preferentially binds to linear di-ubiquitin chain, whereas ZF^{CEP55} marginally bind to non-degradative linear and K63 chains.

To assess the ability of CEP55 His-NOA to bind to poly-ubiquitin chains, we next performed qualitative Ni-NTA pull-down experiments in the presence of increasing concentrations of purified K63 and M1-linked tetra-ubiquitin (Ub₄) chains (**Figures 2A and 2B**). As negative control, we used a His-tagged recombinant protein (His-DARPin noted CTRL), which does not bind at all any mono or poly-ubiquitin chains even at high concentration (10 mM ubiquitin site concentration). As shown in **Figures 2A and 2B**, a specific binding of CEP55 His-NOA to K63- and M1- Ub₄ was observed in a dose dependent manner. Interestingly enough, similar pull-down experiments using different linkage types revealed that CEP55 NOA preferentially recognizes non-degradative M1 and K63-linked Ub₄ chains over K48- and K11-linked Ub₄ chains (**Figure 2C**), indicating that CEP55 His-NOA prefers to interact with open and even extended conformations of Ub₄. These results were surprising since isolated NOA/UBAN domain of NEMO as well as its NEMO-related protein OPTN and ABIN2 was reported to exhibit a strong linkage specificity for short M1 over K63 di-ubiquitin chains [76, 143, 144]. A possible explanation could be that pull-down experiments are only qualitative and performed under non-equilibrium conditions. For this reason, we next characterized the interaction between CEP55 His-NOA and K63- or M1-Ub₄ chains by determining association (kon) and dissociation (koff) rate constants using biolayer interferometry (BLI) technology (**Figures 2D and 2E**). In this experiment, CEP55 His-NOA was first immobilized on penta-His biosensors and incubated with different concentrations of K63-or M1-Ub₄. A K_D value of 27 μM for M1-linked Ub₄ chains was observed (**Figure 2E**), which is 30-fold lower than that of K63-linked Ub₄ (**Figure 2D**), indicating that CEP55 NOA selectively binds to M1 poly-ubiquitin chains *in vitro*.

In a similar way, we next characterized the ability of CEP55 ZF to bind to K63 and M1 poly-ubiquitin chains by BLI. A mixture of biotinylated K63 poly-ubiquitin chains (Ub_{2,7}) and GST-Ub₂ M1 were immobilized on streptavidin (**Figure 2F**) and anti-GST antibody (**Figure 2G**) biosensors, respectively, before being incubated with increasing concentrations of a StrepII tag version of CEP55 ZF peptides (STII-CEP55 ZF). CEP55 ZF similarly binds K63 Ub_{2,7} poly-ubiquitin chains and GST-Ub₂ M1, since similar K_D values of 2.1 and 1.6 μM were obtained, respectively. This ubiquitin binding activity was specific because no binding was observed with a mixture of biotinylated K48 Ub_{2,7} chains (**Figure 2H**), indicating that CEP55 ZF preferentially recognizes K63 and M1 chains over K48 poly-ubiquitin chains.

We also confirmed the specific binding in solution of CEP55 ZF to mono- and K63 di-ubiquitin by fluorescence polarization (FP) experiments using N-terminally fluorescein labeled CEP55 ZF and under more stringent buffer conditions (**Figures S3A and S3B**). It is worth noting that similar binding affinities were observed in solution with mono-ubiquitin and K63 di-ubiquitin, but they were much lower than those obtained with BLI experiments. This is presumably due to the fact that poly-ubiquitin chains were immobilized in BLI experiments whilst they were in solution upon FP experiments (see discussion). Taken together, these data clearly demonstrated that CEP55 contains two UBDs in its C-terminal part; one located at the C-terminal extremity, denoted UBZ^{CEP55}, marginally binds to non degradative linear and K63 chains, whilst the other denoted NOA^{CEP55} preferentially interacts with linear chains,

Structure-based identification of UBZ^{CEP55} mutants defective in ubiquitin binding

Generation of ubiquitin binding defective single point mutants of UBZ^{CEP55}, without altering the overall ZF structure, could be a challenging task since recent crystal complexes of UBZ domains with ubiquitin revealed different modes of ubiquitin recognition (**Figures S4**). Nevertheless, we could classify at least three groups of UBZ domains including FAAP20/Polη ([177], PDB: 3WWQ / [187]), RAD18/WRNIP1, [544] PDB: 5VF0 / [169][34], PDB:3VHT and NDP52 ([186], PDB : 4XKL, also called CALCOCO2) based on their crystal complex structures with Ub (**Figures S4A and S4B**). Structure-based sequence alignment analysis of UBZ^{CEP55} from different organisms with different UBZ groups showed that UBZ-CEP55 displays the highest homology with the RAD18/WRNIP1 UBZ group, suggesting a similar ubiquitin binding mode (**Figure S4C**). In particular, Ub-interacting residues of WRNIP1-UBZ in the β 1-stand, β -loop (the loop between both antiparallel β -strands) and the α -helix of the UBZ $\beta\beta\alpha$ fold are conserved or replaced by functionally equivalent residues in CEP55-UBZ (**Figure S4C**). These residues are also strictly conserved in CEP55 from several organisms (**Figure S4C**). We therefore generated a structural model of CEP55 ZF in complex with ubiquitin, using the crystal structure of the GFP-UBZ-WRNIP1:ubiquitin complex as template (**Figure 3**). According to this model, the CEP55 residue E460 - which is strictly conserved amongst all CEP55 orthologues (**Figure S4B**) - forms a strong binding determinant of the complex by making a dual salt bridge with R42 and R72 of ubiquitin (**Figure 3A**). To validate our hypothesis, we generated an N-terminally fluorescein-labeled CEP55 ZF mutant (F-ZF E460A) as well a Strep-tag II version of CEP55

ZF mutant (STII-CEP55 ZF E460A) containing the E460A single point mutation. F-ZF E460A displayed an almost 20 fold weaker affinity compared to WT for mono-ubiquitin when determined in solution by FP (**Figure 3B**). We confirmed this drastic loss of affinity of the E460A mutant by BLI using immobilized GST-Ub2 M1, since binding affinity of the E460A UBZ mutant was 26-fold reduced compared to the WT (**Figure 3C**).

We then verified whether the E460A mutation impedes the ability of UBZ^{CEP55} to interact with ubiquitin and not the overall structure of UBZ domain. For this purpose, we investigated the zinc-induced folding of the E460A mutant (ZF^{CEP55} (W) E460A) by measuring its internal FRET efficiencies from tyrosine to tryptophan. Similar fluorescence emission spectra of the WT and E460A mutant with or without the presence of Zn²⁺ indicated a similar folding (**Figure S5A**). Consistently, similar gains of internal FRET efficiencies from tyrosine to tryptophan were observed for the WT and E460A after the zinc addition (**Table 1**). Furthermore, Zn²⁺ titration experiments by fluorescence combined with a PAR colorimetric assay (data not shown) showed similar binding affinities and binding stoichiometries of the WT and E460A UBZ mutant (**Figure S5B**). Thus, these data in agreement with our structural model indicate that the E460A mutation in UBZ^{CEP55} is a crucial binding determinant for ubiquitin recognition and does not alter the proper folding of ZF structure.

CEP55 ZF and its ubiquitin binding ability are necessary for CEP55 recruitment to the midbody

To study the functional role of UBZ^{CEP55} in the context of the full-length protein, we next carried out functional rescue experiments in HeLa cells. For this purpose, endogenous CEP55 was knocked-down by siRNA and transiently reconstituted with siRNA resistant plasmids encoding for CEP55 WT (HA-CEP55 WT), a debilitating double mutant (HA-C440A/C443A) - which is unable to tetra-coordinate the zinc atom – and the E460A single-point mutant defective in the ubiquitin binding (HA-CEP55 E460A). As shown in **Figure 4A**, the knock-down of endogenous CEP55 by siRNA was very efficient and ectopic expressions of the WT and its single and double mutants gave similar expression levels of CEP55 as judged by Western-Blot. As previously reported in different studies, the knockdown of CEP55 leads to an increase of cells connected by an intercellular bridge (**Figures 4A and S6A**) and of multinucleated cells (**Figures 4B and S6A**). These phenotypes were partially restored by the expression of the HA-CEP55 WT protein (**Figures 4A, 4B and S6A**). We do believe that the incomplete rescue was due to technical issues to reach simultaneously very high transfections efficiencies with both DNA and siRNA and also to intrinsic properties of

the CEP55 protein, which leads to mainly insoluble protein under transient expression conditions, as previously described [469] (**Figure S6C**). In addition, it is likely that the insoluble form of CEP55 could trap the soluble and functional form of CEP55 and so contributes to an incomplete rescue. Nevertheless, this rescue was statistically significant and reproducible (n=3 with more than 300 nuclei analyzed by experiment) (**Figures 4A and 4B**). Strikingly, neither the CEP55 C440A/C443A double mutant nor the CEP55 E460A single-point mutant were able to functionally rescue normal cytokinesis as does the WT, as judged by the increase of cells connected by a midbody and of multinucleated cells induced by CEP55 knock-down. These data clearly indicated that CEP55 ZF and its ubiquitin binding ability are crucial for CEP55 function during abscission. Moreover, the C440A/C443A double mutant and the E460A single-point mutant, unlike the WT, were unable to functionally restore the accumulation of midbody remnants induced by CEP55 depletion (**Figure S6B**), highlighting a critical role of UBZ^{CEP55} in remnant midbody clearance.

Next, we assessed whether UBZ^{CEP55} could be involved for CEP55 recruitment to the midbody. Because transient expression of the ectopic CEP55 could interfere with the endogenous CEP55 via the formation of hetero-oligomers, similar functional rescue experiments and knock-down of endogenous CEP55 were performed. Interestingly enough, while HA-CEP55 WT was recruited to the midbody, neither the C440/C443A double mutant nor the E460A single-point mutant were found to co-localize with the midbody (**Figure 4C**). Image quantification using MKLP1 as midbody-reporter confirmed the defect of both mutants in CEP55 recruitment to the midbody compared to the WT (**Figure 4D**). In line with this, the Alix endogenous protein, which is a well-known protein partner of CEP55, also exhibited a co-localization defect with the midbody with both mutants but not the WT, using again MKLP1 as midbody-reporter (**Figure S6D**).

Taken together, these results showed that the UBZ^{CEP55} UBD and its ubiquitin binding properties are crucial for CEP55 recruitment to the midbody, allowing CEP55 to ensure proper abscission and midbody remnant clearance.

Structure-based identification of CEP55 NOA mutants unable to bind ubiquitin

The mode of linear di-ubiquitin recognition by the NOA domain (also called UBAN) originally found in the NEMO protein [76] was recently confirmed by two other NEMO-like proteins called Optineurin [143] and ABIN2 [144]. Indeed, structural comparison of NEMO NOA in complex with a M1-linked di-Ub with recent crystal structures of Optineurin with a linear di-Ub chain [143] and ABIN2 with a linear tri-UB chain [144] revealed a highly

conserved binding mode of NOA with two M1-linked units of ubiquitin (**Figure S7**). Contrary to UBZ family, the NOA UBD forms a long parallel α -helical coiled-coil dimer, in which one monomer mainly interacts with the distal Ub (2nd Ub), whereas the other monomer interacts with the proximal ubiquitin (1st Ub). This explains why the NOA dimeric state is required for ubiquitin binding. Structure-based sequence alignment of NOA UBD family with CEP55 from different organisms showed the presence of conserved or functionally equivalent ubiquitin-interacting residues with both proximal and distal ubiquitin. This sequence conservation suggests that CEP55 binds to a di-Ub chain in a similar manner to NOA family, and the degree of conservation of each position was higher between CEP55 and ABIN2 NOA, especially when compared to residues interacting with proximal ubiquitin (**Figure S7**). In a similar way to UBZ^{CEP55}, we generated a structural model of CEP55 NOA in complex with a linear di-Ub chain using the linear diubiquitin:NOA complex of NEMO as structural template (PDB : 2ZVO) (**Figure 5A**). According to the model, L351, Q354 and Q355 interact with the I44 centered hydrophobic patch of the distal ubiquitin (**Figure 5A, left panel**). L351 and Q355 residues are perfectly conserved in all the NOA family and CEP55 orthologs, while Q354 is only conserved in ABIN2. Moreover, D362 and F363 interact with the C-terminal tail of distal ubiquitin and are strictly conserved in all the NOA family (**Figure 5A right panel and S7**).

To validate the importance of these ubiquitin-interacting residues, we purified to homogeneity two His-NOA mutants containing either the L351A/Q354A/Q355A triple mutation or D362R/F363P double mutation and assessed their affinities with M1-linked tetra-ubiquitin by BLI. A deletion mutant of the residues 343-364 corresponding to the minimal NOA site was also generated taking into account the nature of the heptad repeats in the coiled-coil dimer. For all of the three mutants, we observed drastic losses of binding affinity for M1-linked Ub₄ compared to the WT (more than 500 fold) (**Figure 5B, S8A, S8B and S8C**), indicating that the mutated residues within double and triple mutants correspond to critical ubiquitin binding determinants in agreement with structural model. To determine whether these mutations also caused global disruption of the dimeric coiled-coil structure, we next analysed the mutants by SDS-PAGE in the absence of the reducing agent DTE (**Figure S8D**) and by SEC-MALS (**Figure S8E**). The L351A/Q354A/Q355A triple mutant and the deletion mutant form considerably less stable dimers than the WT, as no dimers with both mutants were detected by SDS-PAGE in the absence of DTE (Figure S8D) and SEC-MALS (**Figure S8E**). For the D362R/F363P double mutant, a significant amount of dimers could be

detected in SDS-PAGE without DTE (**Figure S8D**), indicating that this mutant forms more stable dimers than the triple and deletion mutants. Nevertheless, the D362R/F363P mutant dimer was less stable than the WT, as judged by the dimer/monomer ratio of the mutant in SDS-PAGE without DTE, which is significantly lower than the WT. Furthermore, no dimer with mutant could be observed with SEC-MALS. Rather, we could detect a more compact second form of monomer, which likely results from the replacement of Phe363 by Pro363 in this mutant. Therefore, all structure-guided mutants generated from the structural model displayed a total loss of ubiquitin binding activity, but they also displayed a defect in dimerization properties to varying extents.

CEP55 NOA is absolutely required for normal cytokinetic abscission, but not for CEP55 and Alix recruitment to the midbody

In a similar way to the UBZ^{CEP55} studies, we investigated the functional importance of CEP55 NOA UBD by carrying out functional rescue experiments in HeLa cells. To this end, we generated the D362R/F363P double mutant in the context of the full-length CEP55 protein. As shown in **Figure 6A**, the protein expression level of the D362R/F363P double mutant was similar to that of the WT. Nevertheless, it is worth noting that a significant portion of the WT and mutant proteins were found in the insoluble fraction of cell lysates, as previously described for CEP55 UBZ mutants (**Figures S6C and S9C**). Importantly, ectopic expression of D362R/F363P double mutant was not able to restore the CEP55 knock-down-induced decrease of cells connected by an intercellular bridge as the WT (**Figure 6A**). On the other hand, the amount of multinucleated cells was almost similar in cells expressing either the double mutant or the WT (**Figure 6B**). While an increase of cells connected by an intercellular bridge reflects a delay in the abscission process, the formation of multinucleated cells results more from a drastic abscission defect and/or an earlier event involved in the stabilization of the intercellular bridge and midbody integrity. In the case of CEP55, previous studies showed CEP55 plays crucial roles in midbody integrity [356, 357] as well as in the abscission process [402, 443, 444]. Consistent with previous studies, we conclude that the CEP55 NOA UBD plays an important role in CEP55 during abscission, albeit to a lesser extent than UBZ-CEP55, and does not appear to be involved in the stabilization of the intercellular bridge or seems less important than CEP55 ZF in the abscission process.

Moreover, although the D362R/F363P double mutant exhibits a defect in the abscission process, it is normally recruited to the midbody, indicating that the detrimental effect of the mutant occurs downstream its recruitment to the midbody (**Figures 6C and 6D**).

Consistently with these data, we also observed that the D362R/F363P double mutant recruits Alix to the midbody as efficiently as the WT (**Figure S9D**), suggesting that the EABR domain is not altered in its dimeric state in the context of the full-length protein.

Finally, we quantified the percentage of the remnants by cell using knock-down HeLa cells of CEP55 expressing either the WT or the double mutant (**Figure S7**). No difference was observed between the WT and the double mutant, indicating that CEP55 NOA is not involved in CEP55 midbody remnant clearance.

Altogether, our results showed that NOA UBD plays an important role in cytokinetic abscission, albeit to a lesser extent than UBZ^{CEP55} UBD, and is not involved in CEP55 nor in Alix recruitment to the midbody neither in midbody remnant clearance.

UBZ^{CEP55} functions as a new cargo receptor to the midbody in a ubiquitin dependent manner

We next focused our studies on the UBZ-dependent recruitment of CEP55 to the midbody. If UBZ^{CEP55} forms an autonomous UBD domain for this cargo receptor activity to the midbody, thus, any fusion proteins which only contains the UBZ^{CEP55} domain should be specifically recruited to the midbody. For this purpose, we generated a GFP-UBZ^{CEP55} construct and investigated by fluorescence microscopy its cellular localization. As shown in **Figures 7A and 7B**, GFP-UBZ^{CEP55}, but not GFP alone, co-localized with the midbody marker, MKLP-1, indicating that UBZ^{CEP55} exhibits a specific cargo receptor activity to the midbody. This was not due to the differences of protein expression level because GFP and GFP-UBZ^{CEP55} were expressed as similar levels in cells (**Figure 7C**). Because endogenous CEP55 could interfere with the GFP-UBZ^{CEP55} recruitment to the midbody, we then repeated experiments in CEP55 knock-downed HeLa cells, concomitantly expressing GFP alone or GFP-UBZ^{CEP55} (**Figures S10A and S10B**). No significant difference in the cargo receptor activity was observed in cells transfected with a siRNA control and CEP55 specific siRNA, demonstrating that the endogenous CEP55 does not interfere with the recruitment of GFP-UBZ^{CEP55} to the midbody.

We next addressed the question whether this CEP55 UBZ-dependent cargo receptor activity depends on its ability to bind to ubiquitin and whether this ubiquitin binding depends on one type of M1- or K63-linkage of polyubiquitin chains. For these experiments, we had to generate CRISPR-Cas9-mediated CEP55 knockout U2OS cell lines to increase the sensitivity of our functional complementation assay. We also generated different CEP55 chimeric proteins in which the CEP55 UBZ was replaced with other classes of UBD based on small ZF

modules known to interact with ubiquitin such as UBZ^{WRNP1}, UBZ^{RAD18}, UBZ^{NDP52}, nZF2^{TAB2} and A20^{ZF7} (**Figure 7D**). UBZ^{WRNP1} and UBZ^{RAD18} were chosen because their crystal structures showed a similar binding mode to ubiquitin, which is likely close to that of UBZ^{CEP55}. In addition UBZ^{WRNP1} exhibits no ubiquitin linkage specificity, whereas UBZ^{RAD18} exhibits a little preference for K63- over K48-polyubiquitin (4-fold, [173]). UBZ^{NDP52}, which is also built on a $\beta\beta\alpha$ fold is structurally related to UBZ^{WRNP1} and UBZ^{RAD18}. However, it uses a different mode of ubiquitin recognition (**Figure S4C**) and was reported to have no specificity for one type of ubiquitin linkage [177]. By contrast nZF2^{TAB2} and A20^{ZF7} display strong linkage specificity for K63- and M1-polyubiquitin chains, respectively, but they are likely structurally different from UBZ^{CEP55}. CEP55 knockout U2OS cells were transiently reconstituted following transfection with different plasmids encoding for either the WT, a debilitating double mutant (C440A/C443A, unable to form a ZF structure) or the chimeric CEP55 proteins bearing different UBD based on ZF module. Reconstituted cells were then analyzed by immunofluorescence and the levels of expression controlled by Western-blot before quantifying the percentages of co-localization between CEP55 and the midbody marker, MKLP-1. As shown in **Figure 7D**, CEP55 Δ ZF-UBZ^{RAD18} totally restores as the WT the CEP55 recruitment to the midbody, while the debilitating double mutant does not. All chimeric CEP55 proteins were expressed at a similar level in U2OS cells. The four other chimeric CEP55 proteins also complement the cargo receptor activity of CEP55, but to in a lesser extent than the WT. Nevertheless, CEP55 Δ ZF-UBZ^{NDP52} significantly displays a better restoration than those of CEP55 Δ ZF-UBZ^{WRNP1}, CEP55 Δ ZF-nZF2^{TAB2} and CEP55 Δ ZF-A20^{ZF7}, which partially complement the CEP55 recruitment to the midbody at a similar level. Importantly, no significant difference was observed between CEP55 Δ ZF-nZF2^{TAB2} and CEP55 Δ ZF-A20^{ZF7}, indicating that no predominant M1 or K63 linkage is required for the CEP55 UBZ-dependent cargo receptor activity of CEP55. Based on these experiments, we can conclude that the ubiquitin binding ability of CEP55 UBZ is required to specifically target the CEP55 protein to the midbody. In addition, no significant linkage preference for M1 or K63- linked chains was observed for this cargo receptor activity to the midbody, consistent with the ubiquitin binding properties of CEP55 UBZ.

DISCUSSION

In addition to NEMO and its related proteins, Optineurin and ABIN2, we identified here the CEP55 protein as a new member of this family protein, which contains both NOA/UBAN and UBZ domains in the C-terminal part of the protein. Although we did not determine the tridimensional structures of these UBDs, we showed strong evidences by structure-guided sequence alignment analysis and biochemical and biophysical experiments that the predicted CEP55 NOA fragment (residues 304-396) adopts a α -helical coiled-coil dimer and the C-terminal region (residues 435-464) a ZF/UBZ architecture, which are structurally similar to those NEMO, Optineurin and ABIN2 proteins. Based on these experiments, we generated structural models of both CEP55 NOA and UBZ domains, which are fully consistent with mutagenesis data and allowed us to identify several mutants defective in ubiquitin binding. These generated mutants in each domain and in the context of the full-length protein, also permitted to show the functional importance of these NOA and UBZ domains for the CEP55 function in cell division and specifically in cytokinetic abscission.

Despite an extensive search of crystallization conditions and generation of different constructs, no high quality diffraction crystals of CEP55 NOA or CEP55 UBZ with or without ubiquitin could be obtained. For NOA, this was likely due to its high tendency to form higher order oligomers (mainly hexamers), which probably results from the assembly of three dimeric units. In the case of CEP55, this was due to its poor solubility at high concentration as judged by dynamic light scattering experiments (data not shown). Moreover, this tendency of recombinant or synthetic CEP55 UBZ to aggregate and collapse when used at a concentration above 50-70 μ M prevented us to determine its structure by NMR, contrary to NEMO UBZ for which we successfully solved the NMR structure [145].

Although CEP55 NOA is structurally similar to that of NEMO and its related-proteins, Optineurin and ABIN2, some characteristic features of CEP55 were observed. First, the nature of the typical seven-residue periodicity (abcdefg)_n, known as the heptad repeat, significantly differs from that of NEMO in the N-terminal part of the NOA domain, also called the CC2 region in NEMO. Indeed, four hydrophobic residues at a and d heptad positions in NEMO (a: L260, L274 M295; d: A270), which are crucial for the dimer stability, are replaced by polar and charged residues in CEP55 (a: N311, S325, Q346; d: E321). The presence of these polar and charged residues could destabilize the hydrophobic packing of the α -helical coiled-coil dimer in the N-terminal region of CEP55 NOA, providing a possible

explanation why the CEP55 NOA forms a less stable dimer than that of NEMO with a dimerization constant, which is about 6-fold lower than that of NEMO [142]. In line with this, caution also should be taken on the apparent linkage selectivity for linear chains observed with the isolated NOA of CEP55. Indeed, previous crystal structures of NOA complexes with K63- and M1-linked di-ubiquitin chain revealed the interactions with the two ubiquitin moieties of M1-linked di-ubiquitin chain (distal and proximal), whilst only the distal ubiquitin moiety interacts with the K63-linked di-ubiquitin chain. These differences in ubiquitin binding mode can lead to a more stabilizing effect on the NOA dimerization with the linear chain compared to K63 chains. Thus, the differences of affinity between linear and K63 chains for NOA CEP55 could be artificially enhanced by the dimerization effect induced by linear chain binding, possibly leading to an overestimation of linkage selectivity of CEP55 NOA for linear chains over K63 chains.

Even though size exclusion chromatography showed that the D362R/F363P eluates into two well-separated elution peaks, multi-angle light scattering analysis pointed out that the two peaks correspond to monomeric species with the same molecular mass, indicating that this NOA double mutant adopts two different monomeric forms in solution (**Figure S6E**). One monomeric species appears to be more elongated with a higher frictional coefficient compared to the second monomeric species, which displays the same elution profile as that observed with the WT and the L351/Q354A/Q355A triple mutant. Because the proline can adopt two *cis* and *trans* conformations in protein, the presence of this less compact second monomeric species is compatible with the F363P substitution in the NOA double mutant.

Moreover, the SDS-PAGE analysis under non-reducing conditions points out that the dimerization properties of the D363R/F363P double mutant are partially altered compared to the WT, while those of the L351/Q354A/Q355A triple mutant are totally abolished (**Figure S6D**). Thus, the triple mutation induces a more destabilizing effect on CEP55 NOA dimerization than the double mutant. In the light of the structural model shown in **Figure 5**, it is tempting to speculate that each Q354 of one monomer makes a specific hydrogen bond with the sulfur atom of each M351 belonging to the second monomer, giving a possible explanation why a drastic destabilization of the CEP55 NOA dimeric state was observed with the L351A/Q354A/Q355A triple mutant. Notably, it is worth pointing out that a tight coupling between dimerization and ubiquitin binding was previously observed in studies with the NOA/CC2-LZ domain of NEMO [142]. Therefore, finding mutations in CEP55 NOA, which only alter ubiquitin binding without interfering with the dimerization process, could be a challenging task, which could be insurmountable at the current stage without prior

knowledge of the crystal structures of the apoform and complexed form of CEP55 NOA with an ubiquitin chain.

When analyzing ubiquitin binding properties of CEP55 UBZ, different binding affinities were observed when we determined dissociation constants in solution by fluorescence polarization and BLI experiments. Even if we did not strictly compare the same type of K63-linked chain in FP (K63-UB₂) and BLI experiments (K63-Ub_{2,7}), these differences in binding affinity cannot probably be due to the differences of the chain length. First, the mixture of K63-linked UB_{2,7} chains used in BLI experiments mainly contains di-ubiquitin and tri-ubiquitin chains and only a minor amount of Ub₄₋₇ chains. Second, the experimental conditions used in solution and BLI experiments were different. Indeed, the DDM detergent was added at 0.1% in FP experiments because it was required to prevent the non-specific binding between ubiquitin and the fluorescein conjugated to CEP55 UBZ. This may considerably reduce the ubiquitin-binding constant by disrupting the hydrophobic interactions on the I44-centered hydrophobic interface of ubiquitin. Moreover, the ubiquitin chain used was in solution in FP experiments whereas, it was immobilized in BLI experiments. This could affect the binding entropy and may contribute to the difference of binding affinity observed between solution and BLI binding studies. Similar conflicting results between solution and pull-down binding studies were also reported with TAB2 NZF to assess the linkage selectivity between K48 and K63 Ub₂ and Ub₄ chains [161].

Importantly, recent studies reported that CEP55 mutations are responsible for two human pathologies named MARCH [483] and Meckel-like syndrome [545], which exhibit some similar clinical signs. Hypomorphic CEP55 mutations were found to be associated with MARCH, which is a severe and autosomal-recessive syndrome that affects neuronal mitosis. The developmental features of MARCH include hydranencephaly, anhydramnios, renal dysplasia and cerebellar hypoplasia. Amorphic CEP55 mutations were reported to be associated with the Meckel-like syndrome and with *in utero* lethality. This syndrome is linked to cilia-related disorders, called ciliopathies, and some clinical signs detected in the affected fetus are similar with MARCH, including aberrant developments of brain and cerebellum, renal cysts and oligohydramnios. Importantly, the MARCH-related p.S425X mutation (c.1274 C>A), which has a similar CEP55 expression level compared to a healthy patient control [483], corresponds to a deletion of the UBZ. Strikingly, this p.S425X mutation exhibits a defect in CEP55 recruitment to the midbody like the C440A/C443A debilitating double mutant investigated in the present study. Therefore, it is tempting to speculate that all mutations of CEP55 that alter the UBZ structure by modifying the zinc-ion-coordinating

residues (C440, C443, H458 and C462) or that impair its ubiquitin binding properties like the E460A single mutant, may also lead to the MARCH syndrome. It is also tempting to predict that the extent and severity of the clinical signs found in MARCH and Meckel-like syndromes could be correlated with mutations found in the CEP55 NOA and UBZ domains, taking into account our findings that mutations located in CEP55 UBZ lead to a more severe defect in cytokinetic abscission than those contained in NOA.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

A detailed description of all experimental procedures is provided in the supplemental information

Cell culture, transfections, cell-lysis and Western-Blot

Human HeLa cells (American type Culture Collection) were grown in DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum, penicillin (50 units/ml) and streptomycin (50µg/ml). Human U20S WT (American type Culture Collection) and U20S K.O CEP55^{-/-} were grown in the same conditions without antibiotics.

For functional complementation experiments with HA-CEP55 plasmids, HeLa cells were first seeded in 6 well dishes and *extemporaneously* transfected with the siRNAs. After 24 h, cells were washed in DMEM and transfected with 1 µg of the different plasmids. 24 h later cells were briefly trypsinized before being seeded and transfected a second time with the siRNAs. Cells were fixed and imaged or lysed for Western-Blotting 96h post 1st siRNA transfection. For GFP and GFP-ZF^{CEP55} transfections, HeLa cells were seeded with or without siRNAs and transfected 9 hours later with 2 and 0.5 µg of plasmids in 6 wells or in 24 wells, respectively. Cells were fixed in PFA 4% or lysed 40 h post-transfection. U20S WT and CEP55^{-/-} were transfected in a 6 well dishes with 200 ng of the different plasmids upon 1µg of total DNA (50 ng / 250 ng total DNA for a 24 well) before being fixed in methanol 100% or lysed 48h post-transfection.

For all siRNA transfections, HiPerFect (Qiagen) was used to transfect N-T or CEP55 siRNA (24 nM) according to manufacturer's instructions. FuGENE HD (Promega) was used for all DNA transfections according to the manufacturer's instructions.

HeLa cells were lysed on ice in a RIPA buffer containing 50 mM Tris HCl pH 7,2, 150 mM NaCl, 5mM EDTA, 0,1% SDS, 1% Déoxycholate,1% Triton X100 and a mixture of protease inhibitors (Complete, Roche) for 35 min at 4°C. Lysates were centrifuged at 17000 x g for 15 min. Supernatants (soluble fraction) were mixed with 4X XT Sample buffer (Biorad) and 50 mM DTT and pellets (insoluble fraction) were solubilized in Sample buffer before being boiled for 10 min. U20S cells were directly lysed in XT Sample buffer and boiled during 10 min.

Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Immunoreactive proteins were visualized by chemiluminescence.

BLI experiments

Biolayer interferometry (BLI) experiments were performed on a BLItz system (Fortebio) at room temperature. GST-ub2 M1 (20 μ M) was immobilized on anti-GST biosensors (Fortebio) in Tris HCL 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, TCEP 0.1 mM which were pre-equilibrated in the same buffer. The biosensors were then incubated with Tris HCL 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, TCEP 0.1 mM, ZnCl₂ 1 mM before adding various concentrations of Strep-tag-II WT ZF CEP55 (25-12.5-6.25-1 μ M) and E460A ZF CEP55 (25-12.5-6.25 μ M) which were prefolded in the same buffer in 1mM Zncl2 during 5 min at room temperature. The dissociation of the complexes on the biosensors was performed by incubating them in the peptide free buffer. Lys-63 Ub2-7 (0.2 mg/ml) was immobilized on SA-streptavidin biosensors (Fortebio) before adding various concentrations of WT strep-tag-II ZF CEP55 (20-10-5-1 μ M) in Tris HCL 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, TCEP 0.1 mM, ZnCl₂ 100 nM which were prefolded in the same buffer during 5 min at room temperature. For the biotin Lys-48 Ub2-7 /Strep-tag-II -WT ZF CEP55 binding assay, Lys-48 Ub2-7 (0.2 mg/ml) was immobilized on biosensor before adding 10 μ M of Strep-tag-II -WT ZF CEP55.

For the CEP55 WT, Δ (343-364), L351A/Q354A/Q355A, D362R/F363P HIS-NOA binding assay with linear tetra-ubiquitin, His-NOA proteins (8 μ M) were immobilized on anti-penta-His biosensors (Fortebio) in Tris HCL 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, TCEP 0.2 mM. Various concentrations of linear tetra-ubiquitin were then incubated with the proteins (20-10-5-2.5 μ M for WT His-NOA and 5-2.5 μ M for the mutants). The dissociation of the complexes on the biosensors was performed by incubating them in the protein free buffer. Steady state analysis in Data Analysis BLItz version 1.2 (Fortebio) was used to calculate the K_D .

Zinc ion Colorimetric Titration Assay

To determine the zinc content of the WT and E460A ZF (W), a colorimetric 4-(2-pyridylazo) resorcinol metal binding assay was used. Briefly, the WT and E460A synthetic peptides were first refolded for 1 h in TrisHCL 50 mM, pH 7.5, NaCl 150mM, TCEP 0.1 mM and 2mM ZnCl₂, and abundantly dialyzed against the same buffer without ZnCl₂ to remove unbound zinc. Protein samples (5–15-25 μ M) were then incubated for 30 min at room temperature with proteinase K (0.1 mg/ml) to completely release the zinc ion before adding 4-(2-pyridylazo)resorcinol (200 μ M). The amount of the released zinc was determined quantifying the (4-(2-pyridylazo)resorcinol)₂-Zn²⁺ complex at 492 nm from a calibration curve, calculated from known concentrations of ZnCl₂.

Structural Modeling

The model of CEP55 ZF in interaction with mono-ubiquitin was generated by homology modeling. The structural model of CEP55 ZF apoform was first generated on the basis of the NMR model of NEMO ZF (2JVX) using the free access server Swiss-model [546]. The model quality was estimated using the Anolea, and verify3D programs, which are available in the Swiss-model workplace and the geometry of the residues was evaluated using the Procheck software [547]. Co-crystal structure of the GFP - ZF WRNIP1 (Werner helicase interacting protein 1) in interaction with mono-ubiquitin (PDB ID : 3VHT) was used as a template for the modelization of ZF CEP55 in interaction with ubiquitin. The complex was modeled by molecular replacement superimposing the C α of ZF CEP55 with WRNIP1 ZF 's and a energy minimization of the complex was carried out using the force fields GROMOS96 [548].

The semi-flexible refinement of the interface between ZF CEP55 and ubiquitin was then performed by simulated annealing using the standard protocols implemented in HADDOCK [549]. The models of CEP55 NOA in interaction with linear di-ubiquitin and with K63 di-ubiquitin were generated according to the same procedure than the ZF model. Briefly, structural model of CEP55 NOA apoform was generated using the free H2O and free ubiquitin co-cristal structure of NEMO NOA in interaction with linear di-ubiquitin (PDB ID : 2ZVO). The semi-flexible refinement of the interface between the two monomers into the apo CEP55 NOA coiled coil was performed by simulated annealing using HADDOCK software. The co-crystal structures of NEMO NOA in interaction with M1- (PDB ID : 2ZVO) or K63-linked (PDB ID : 3JSV) di-ubiquitin were then used as templates and a refinement of the interfaces were carried out.

Pull-down experiments assays

50 μ l of purified CEP55 His-NOA and His-Darpin (used as a negative control) at 8 μ M in TrisHCL 20 mM, pH 8, KCl 50 mM, DDM 0.2 mM, Imidazol 10 mM, Glycerol 10% were incubated for 1h at room temperature with nickel-nitrilotriacetic acid magnetic beads (12 μ l, Invitrogen) which were pre-equilibrated in the protein buffer. The beads were washed 3 times in protein buffer and incubated for 1h at 4°C with increasing concentrations of linear or Lys-63 tetra-ubiquitin (1-2-4-8-16 μ M) in the same buffer. His-darpin was incubated with the highest ubiquitin concentration tested (16 μ M). Three fast washes were then performed at 4°C and the complexes were directly eluted in Sample Buffer in presence of 50 mM DTT before being boiled and analyzed by SDS-PAGE followed by a Coomassie blue staining.

For the linear, Lys-63, Lys-11, Lys-48 tetra-ubiquitin pull-down assay, 16 μ M of various ubiquitins were incubated with CEP55 His-NOA and His-Darpin (8 μ M) was incubated with 16 μ M of linear tetra-ubiquitin.

Immunofluorescence, imaging and quantification

For methanol fixation, cells cultured on glass coverslips were fixed with 100% methanol at 4°C. Cells were progressively rehydrated by successive washes with 85%, 70%, and 50% ethanol in water and two final washes with PBS. For PFA fixation, cells cultured on glass coverslips were fixed with PFA 4% as previously describe [550].

After blocking by incubation with 1% BSA in PBS, the slides were incubated with the primary antibodies, washed, and incubated with species-specific fluorochrome-tagged secondary antibodies. They were washed again and incubated with DAPI (Sigma-Aldrich) to stain the nuclei. The coverslips were mounted in Mowiol and were examined with an ApoTome imaging system (Imager Z1) equipped with a 63 \times /1.4 NA oil differential interference contrast (DIC) objective lens (all from Carl Zeiss). Images were acquired and analyzed with AxioVision software (Carl Zeiss).

For the quantification of the percentage of cells connected by midbodies (%cell-mid), multinucleated cells (%multi) and remnant midbodies/cell (%rem/cell), the different conditions were blind counted. The total number of nuclei (Nnuc) and midbodies (Nmid) were counted automatically using Icy [551] by detecting DAPI stainings and MKLP1 dots respectively. The number of multinucleated cells (Nmulti) and cells connected by midbodies (Ncell-mid) in the different conditions were counted manually. The total number of cells (Ncells), the percentage of cells connected by midbodies, of multinucleated cells and of remnant midbodies/cell were calculated as follow : $N_{\text{cells}} = N_{\text{nuc}} - (N_{\text{multi}} + N_{\text{cell-mid}})$; $\%_{\text{cell-mid}} = (N_{\text{cell-mid}}/N_{\text{cells}}) \times 100$; $\%_{\text{multi}} = (N_{\text{multi}}/N_{\text{cells}}) \times 100$; $\%_{\text{rem/cell}} = (N_{\text{mid}} - N_{\text{cell-mid}})/N_{\text{cells}}$.

For the quantification of CEP55 intensity at the midbody, the midbodies (MKLP-1 positive dots) were detected using spot detector on Icy and were defined as regions of interest. The CEP55, ALIX and MKLP1 intensities in these regions of interest were determined on Icy and the CEP55 and ALIX intensities at the midbody were normalized by MKLP-1's.

For the quantification of the percentage of recruitment to the midbody (% recruitment Mid) of the different CEP55 proteins in CEP55^{-/-} U2OS cells lines, we used a colocalizer script on Icy, which detects the total dots of MKLP1 (MKLP1 dots) and of CEP55 in cells and the colocalized dots (Coloc Dots). The percentage of recruitment was calculated as follow

: % recruitment Mid = Coloc Dots / MKLP1 dots * 100. Relative percentages of recruitments for the different CEP55 proteins compared to WT were then calculated. The percentage of recruitment of GFP or GFP-ZF^{CEP55} to the midbody was calculated in the same way but specifically in transfected cells.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed in Kaleidagraph (4.1.3b1). The non-parametric Kruskal-Wallis test was used to determine statistical significance.

REFERENCES

1. Ganem, N.J., Z. Storchova, and D. Pellman, *Tetraploidy, aneuploidy and cancer*. *Curr Opin Genet Dev*, 2007. **17**(2): p. 157-62.
2. Mierzwa, B. and D.W. Gerlich, *Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control*. *Dev Cell*, 2014. **31**(5): p. 525-38.
3. Gershony, O., et al., *Cytokinetic abscission is an acute G1 event*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(21): p. 3436-41.
4. Chen, C.T., et al., *Resurrecting remnants: the lives of post-mitotic midbodies*. *Trends Cell Biol*, 2013. **23**(3): p. 118-28.
5. Crowell, E.F., et al., *Engulfment of the midbody remnant after cytokinesis in mammalian cells*. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 17): p. 3840-51.
6. Zhao, W.M., A. Seki, and G. Fang, *Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(9): p. 3881-96.
7. Carlton, J.G. and J. Martin-Serrano, *Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery*. *Science*, 2007. **316**(5833): p. 1908-12.
8. Morita, E., et al., *Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis*. *EMBO J*, 2007. **26**(19): p. 4215-27.
9. Fabbro, M., et al., *Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis*. *Dev Cell*, 2005. **9**(4): p. 477-88.
10. Carlton, J.G., M. Agromayor, and J. Martin-Serrano, *Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(30): p. 10541-6.
11. Lee, H.H., et al., *Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55*. *Science*, 2008. **322**(5901): p. 576-80.

12. Ettinger, A.W., et al., *Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 503.
13. Kuo, T.C., et al., *Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(10): p. 1214-23.
14. Bastos, R.N. and F.A. Barr, *Plkl negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission*. J Cell Biol, 2010. **191**(4): p. 751-60.
15. Kamranvar, S.A., et al., *Integrin signaling via FAK-Src controls cytokinetic abscission by decelerating PLK1 degradation and subsequent recruitment of CEP55 at the midbody*. Oncotarget, 2016. **7**(21): p. 30820-30.
16. St-Denis, N., et al., *Myotubularin-related proteins 3 and 4 interact with polo-like kinase 1 and centrosomal protein of 55 kDa to ensure proper abscission*. Mol Cell Proteomics, 2015. **14**(4): p. 946-60.
17. Frosk, P., et al., *A truncating mutation in CEP55 is the likely cause of MARCH, a novel syndrome affecting neuronal mitosis*. J Med Genet, 2017.
18. Komander, D. and M. Rape, *The ubiquitin code*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 203-29.
19. Emmerich, C.H., et al., *Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(38): p. 15247-52.
20. Rahighi, S., et al., *Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation*. Cell, 2009. **136**(6): p. 1098-109.
21. Cordier, F., et al., *The zinc finger of NEMO is a functional ubiquitin-binding domain*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2902-7.
22. Ngadjeua, F., et al., *Two-sided ubiquitin binding of NF-kappaB essential modulator (NEMO) zinc finger unveiled by a mutation associated with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency syndrome*. J Biol Chem, 2013. **288**(47): p. 33722-37.
23. Pohl, C. and S. Jentsch, *Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE*. Cell, 2008. **132**(5): p. 832-45.
24. Mukai, A., et al., *Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 8): p. 1325-33.
25. Matsumoto, M.L., et al., *K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody*. Mol Cell, 2010. **39**(3): p. 477-84.
26. Laplantine, E., et al., *NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain*. EMBO J, 2009. **28**(19): p. 2885-95.
27. Wagner, S., et al., *Ubiquitin binding mediates the NF-kappaB inhibitory potential of ABIN proteins*. Oncogene, 2008. **27**(26): p. 3739-45.

28. Hubeau, M., et al., *New mechanism of X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency: impairment of ubiquitin binding despite normal folding of NEMO protein*. *Blood*, 2011. **118**(4): p. 926-35.
29. Nakazawa, S., et al., *Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 12547.
30. Lin, S.M., et al., *Structural Insights into Linear Tri-ubiquitin Recognition by A20-Binding Inhibitor of NF-kappaB, ABIN-2*. *Structure*, 2017. **25**(1): p. 66-78.
31. Toma, A., et al., *Structural basis for ubiquitin recognition by ubiquitin-binding zinc finger of FAAP20*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0120887.
32. Bomar, M.G., et al., *Structure of the ubiquitin-binding zinc finger domain of human DNA Y-polymerase eta*. *EMBO Rep*, 2007. **8**(3): p. 247-51.
33. Hu, Q., et al., *Mechanisms of Ubiquitin-Nucleosome Recognition and Regulation of 53BP1 Chromatin Recruitment by RNF168/169 and RAD18*. *Mol Cell*, 2017. **66**(4): p. 473-487 e9.
34. Suzuki, N., et al., *A novel mode of ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding zinc finger domain of WRNIP1*. *FEBS J*, 2016. **283**(11): p. 2004-17.
35. Xie, X., et al., *Molecular basis of ubiquitin recognition by the autophagy receptor CALCOCO2*. *Autophagy*, 2015. **11**(10): p. 1775-89.
36. Thach, T.T., et al., *Molecular determinants of polyubiquitin recognition by continuous ubiquitin-binding domains of Rad18*. *Biochemistry*, 2015. **54**(12): p. 2136-48.
37. Grubisha, O., et al., *DARPin-assisted crystallography of the CC2-LZ domain of NEMO reveals a coupling between dimerization and ubiquitin binding*. *J Mol Biol*, 2010. **395**(1): p. 89-104.
38. Kulathu, Y., et al., *Two-sided ubiquitin binding explains specificity of the TAB2 NZF domain*. *Nat Struct Mol Biol*, 2009. **16**(12): p. 1328-30.
39. Bondeson, M.L., et al., *A nonsense mutation in CEP55 defines a new locus for a Meckel-like syndrome, an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy*. *Clin Genet*, 2017. **92**(5): p. 510-516.
40. Arnold, K., et al., *The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(2): p. 195-201.
41. Laskowski, R.A., et al., *PROCHECK-a program to check the stereochemical quality of protein structures*. *Journal of Applied Crystallography*, 1993. **26**: p. 283-291.
42. van Gunsteren, W.F., et al., *Biomolecular simulation: the GROMOS manual and user guide*. 1996, ETH Zürich, Switzerland:vdf Hochschulverlag.
43. de Vries, S.J., M. van Dijk, and A.M. Bonvin, *The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking*. *Nat Protoc*, 2010. **5**(5): p. 883-97.

44. Lobry, C., et al., *Negative feedback loop in T cell activation through IkappaB kinase-induced phosphorylation and degradation of Bcl10*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 908-13.
45. de Chaumont, F., et al., *Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 690-6.

FIGURES

Figure 1: CEP55 contains a NOA and a ZF domain

A) Schematic representation of structural and functional domains of CEP55 and NEMO showing a similar C-terminal architecture encompassing two ubiquitin binding NOA and ZF domains. Sequence numbering is given for the human proteins (NP_001093327.1-NP_001120654.1). KBD : Kinase binding domain ; CC1-2 : Coiled-coil 1 and 2 ; HLX2 : Helical domain 2 ; EABR : ESCRT and ALIX binding region ; NOA (also called UBAN, CoZi, CC2-LZ and NUB) : NEMO, Optineurin and Abin domain; ZF : Zinc-Finger ; UBD : Ubiquitin binding domain. Both EABR and NOA domains form parallel coiled-coil dimers.

B) Normalized far UV circular dichroism spectrum of purified CEP55 His-NOA (0.03 mg/ml at 1°C), showing a high α -helix content compatible with a coiled-coil structure. In inset is depicted the SDS-PAGE analysis of CEP55 His-NOA after staining with blue Coomassie

C) Analysis of CEP55 His-NOA by size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS). M : Monomer ; D : Dimer ; H :Hexamer.

D) Fluorescence emission spectra of CEP55 ZF V438W peptide (2 μ M, hereafter denoted as ZF (W)) in the presence (black) or in absence of zinc ion (gray) after excitation of both tyrosines (Y447 and Y461) and tryptophan (W438) residues at 280 nm. Note that the emission shoulder peak observed in the 300-315 nm region, which is only observed in absence of zinc ion, reflects tyrosine fluorescence emission (Y447,Y461). This shoulder peak disappears and vanishes to the profit of tryptophan emission after ion zinc addition, owing to an increase of Tyr to Trp internal FRET. Inset : Model of CEP55 ZF (W) pointing out that the zinc-induced folding close together the two Y447,Y461 and W438 residues, leading to internal FRET.

E) Fluorescence titration of CEP55 ZF (W) peptide (0.8 μ M) using increasing zinc concentrations (0.1-1.4 μ M) at excitation and emission wavelengths of 280 and 342 nm, respectively. Error bars represent the standard deviation of the fluorescence measurements of each titration point for 5 min.

FIGURE 1

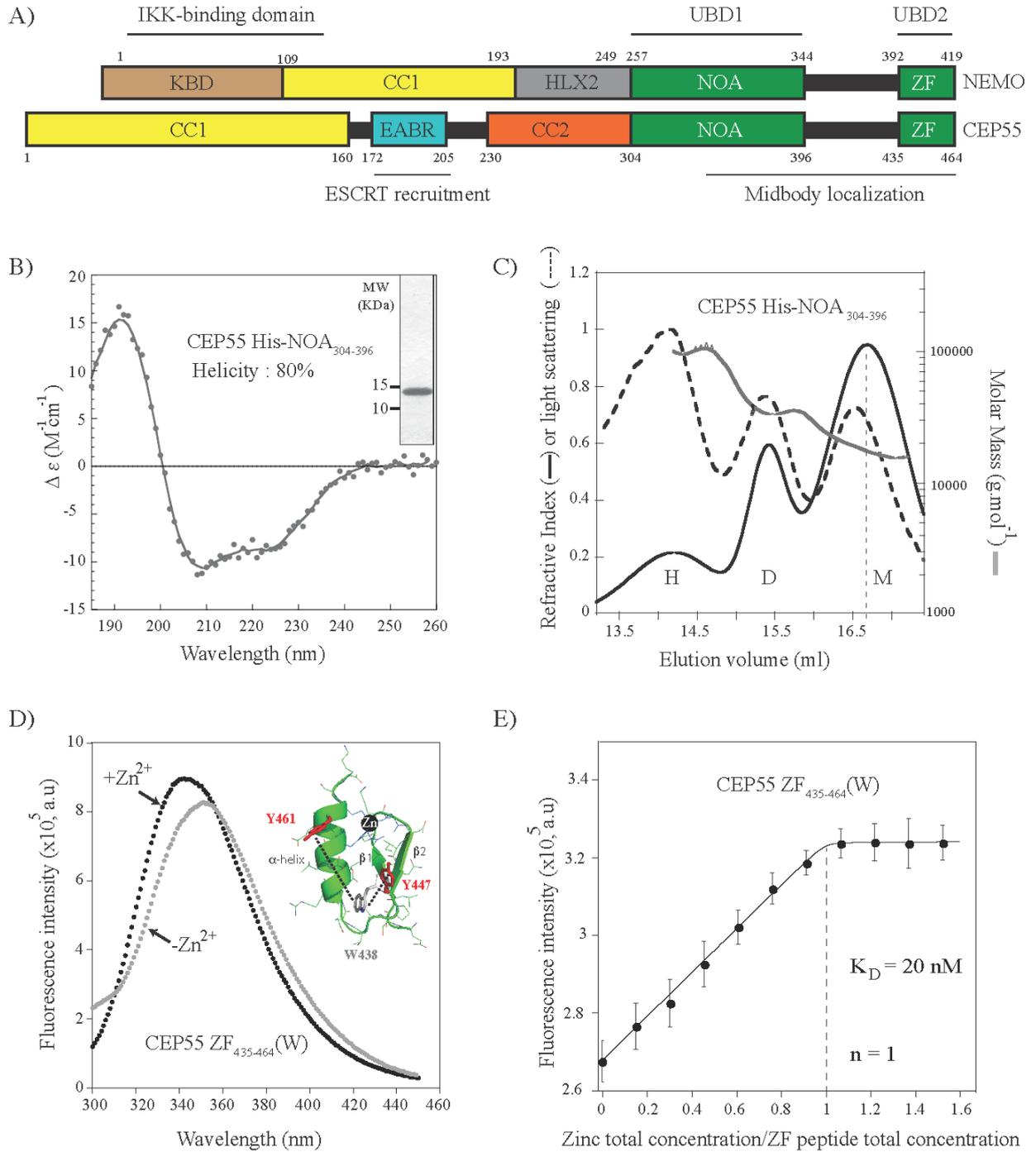


Figure 2: CEP55 NOA and ZF form specific ubiquitin binding domains, which marginally/preferentially bind to non-degradative K63 and M1 poly-ubiquitin chains

(A-B) His pull-down experiments of CEP55 His-NOA (8 μ M) with increasing concentrations of purified A) K63 tetra-ubiquitin and B) linear tetra-ubiquitin (1-2-4-8-16 μ M). Ctrl : negative control (His-DARPin).

C) His pull-down experiment of CEP55 His-NOA (8 μ M) with different linkages of tetra-ubiquitin chains (16 μ M), including M1 (linear), K11, K48 or K63 tetra-ubiquitin as indicated. Ctrl : negative control (His-DARPin).

(D-E) Quantitative ubiquitin binding of CEP55 His-NOA by Biolayer Interferometry (BLI) using various concentrations of K63 (D) or linear (E) tetra-ubiquitin chains (2.5, 5, 10 and 20 μ M). Anti-penta-His biosensors were used in each binding experiment to immobilize 8 μ M of His-NOA (see Experimental Procedures).

F) Quantitative ubiquitin binding of CEP55 Strep-tag II ZF by BLI with a mixture of K63 Ub_{2,7} poly-ubiquitin chains. Biotinylated K63 Ub_{2,7} (0.2 mg/ml) was immobilized on a streptavidin biosensor before adding various concentrations of Strep-tag II CEP55 ZF (2.5, 5, 10 or 20 μ M).

G) Quantitative ubiquitin binding of Strep-tag II CEP55 ZF by BLI with a M1 (linear) di-ubiquitin chain. M1 GST-Ub₂ (20 μ M) was immobilized on an anti-GST biosensor before the addition of Strep-tag II CEP55 ZF at different concentrations (1, 6.25, 12.5 or 25 μ M)

H) Binding comparison of the Strep-tag II CEP55 ZF (10 μ M) by BLI between a mixture of K63-Ub_{2,7} or K48 Ub_{2,7} poly-ubiquitin chains (0.2 mg/ml).

For the experiments shown in (F),(G) and (H), the Strep-tag II CEP55 ZF was each time freshly prefolded with 1 mM ZnCl₂ which was maintained at the same concentration in the binding buffer.

FIGURE 2

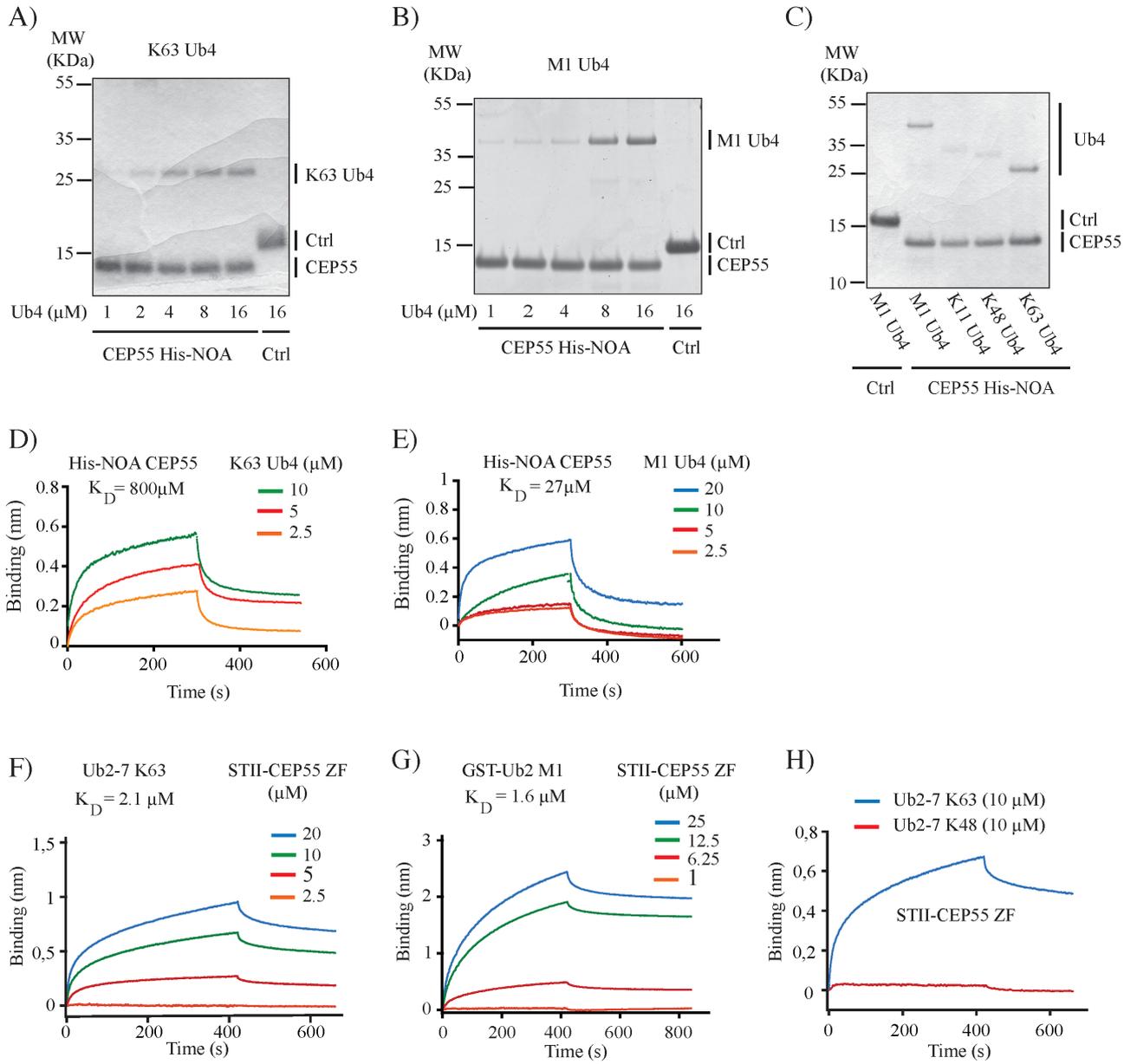


Figure 3: Structure-based identification of ZF single point mutant defective in ubiquitin

A) Structural model of CEP55 ZF (green) in complex with mono-ubiquitin (orange) pointing out E460 as a critical residue which makes a specific salt bridge with R42 and R72 residues of ubiquitin.

B) Mono-ubiquitin titration in solution monitored by fluorescence polarization of fluorescein-labeled WT and E460A mutant CEP55 ZF (10 μ M) in the presence of 1 mM ZnCl₂.

C) Quantitative ubiquitin binding determined by BLI experiment of WT and E460A mutant CEP55 ZF with M1 (linear) di-ubiquitin chain. M1 GST-Ub2 was first immobilized on an anti-GST biosensor before adding various concentrations of WT and E460A mutant CEP55 ZF (6.25, 12.5 and 25 μ M).

For the experiments shown in (B) and (C), all ZF peptides were freshly prefolded in the presence of 1 mM ZnCl₂, which was maintained at the same concentration in the binding buffer.

FIGURE 3

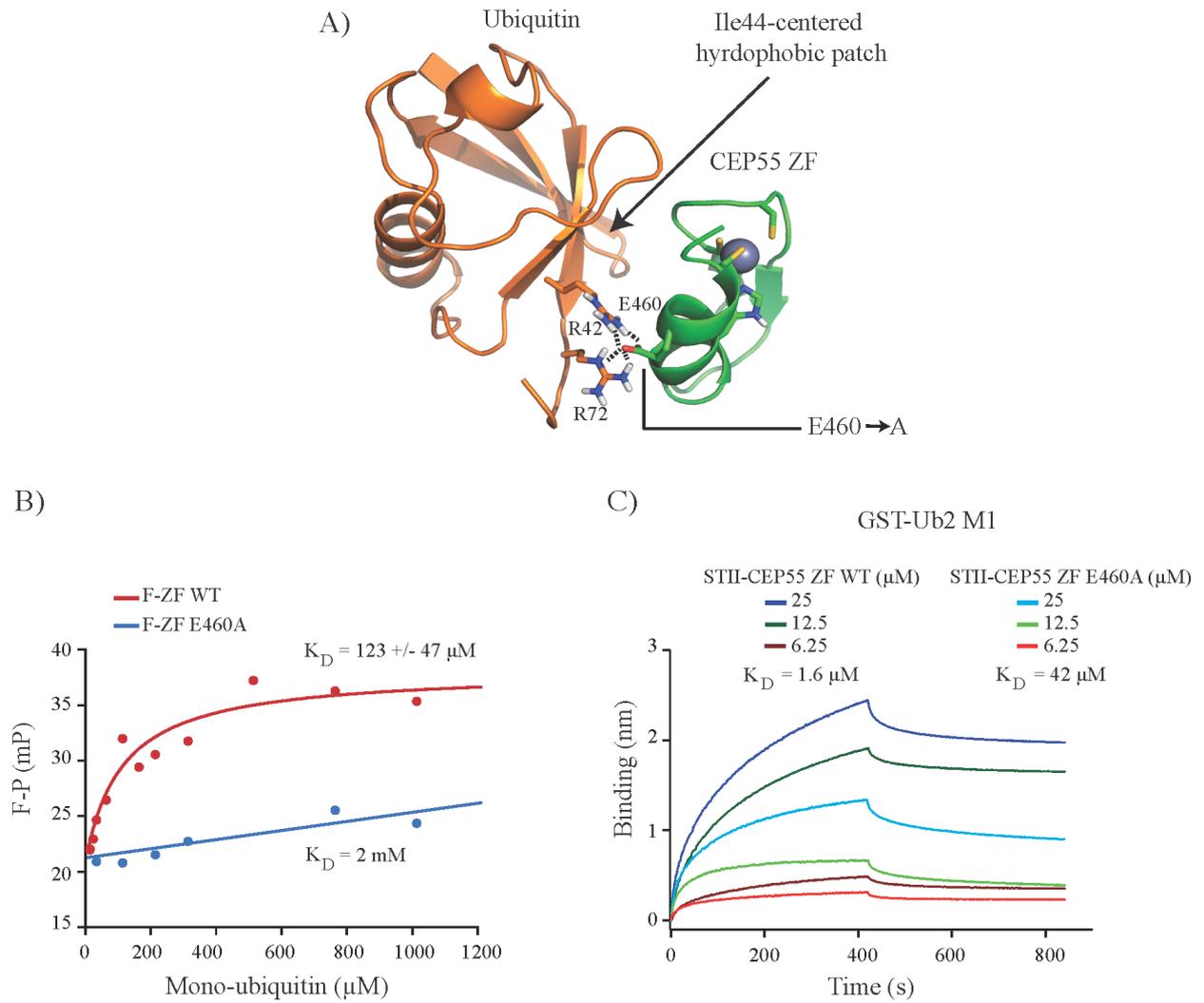


Figure 4: CEP55 ZF is essential for CEP55 recruitment to the midbody and ensures proper cytokinetic abscission

HeLa cells were concomitantly transfected with a non-targeting (NT) or CEP55 siRNA and with an empty vector, or a CEP55 siRNA resistant vector encoding HA-CEP55 WT, HA-CEP55 C440A/C443A and HA-CEP55 E460A.

A) Recruitment to the midbody of HA CEP55 WT, HA CEP55 C440A/C443A and HA CEP55 E460A. Cells were stained with DAPI (blue) and immunolabeled with HA (yellow), MKLP-1 (red) and α -tubulin (cyan) antibodies. Insets show an expanded view of the midbody.

B) Relative quantification of CEP55 intensity at the midbody in the different conditions. Cells were stained with DAPI, CEP55, MKLP-1 and β -tubulin antibodies. Upon MKLP-1 dots CEP55 intensity was normalized by MKLP-1 intensity at the midbody. Analyses were conducted on 3 independent experiments, n represent the total number of midbodies.

(C-D) Analyses of the ZF mutants ability to rescue cytokinesis defect induced by CEP55 depletion. The percentage of cells connected by midbodies (C) and the percentage of multinucleated cells (D) were quantified. Images are represented in FS5A. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments and the total number of nuclei (n) counted in the 3 experiments is indicated. The level of expression of CEP55 in the soluble fraction for the different conditions was controlled by WB.

***p < 0.001 ; *p < 0.05 ; ns : not significant (p \geq 0.05)

FIGURE 4

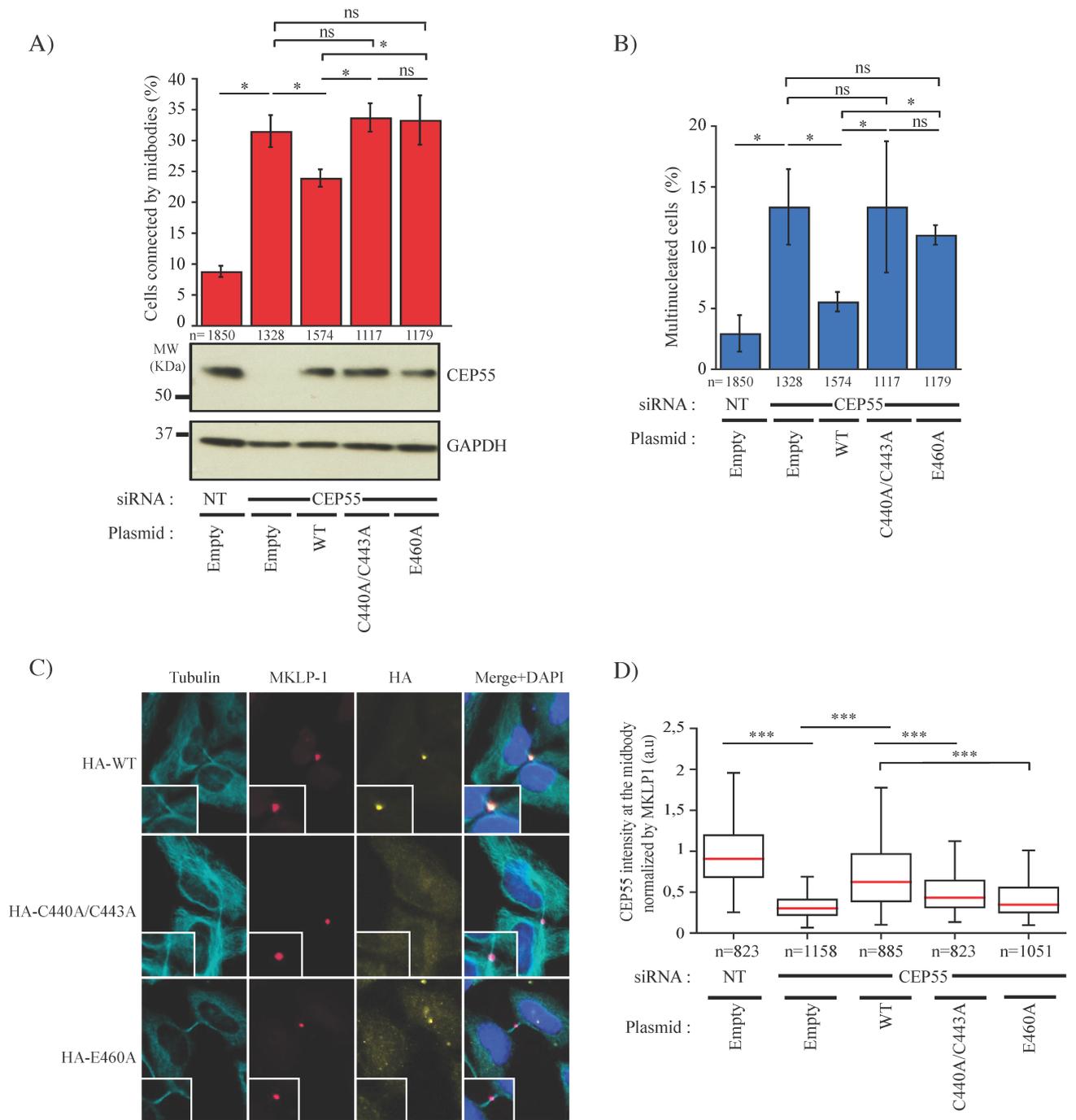
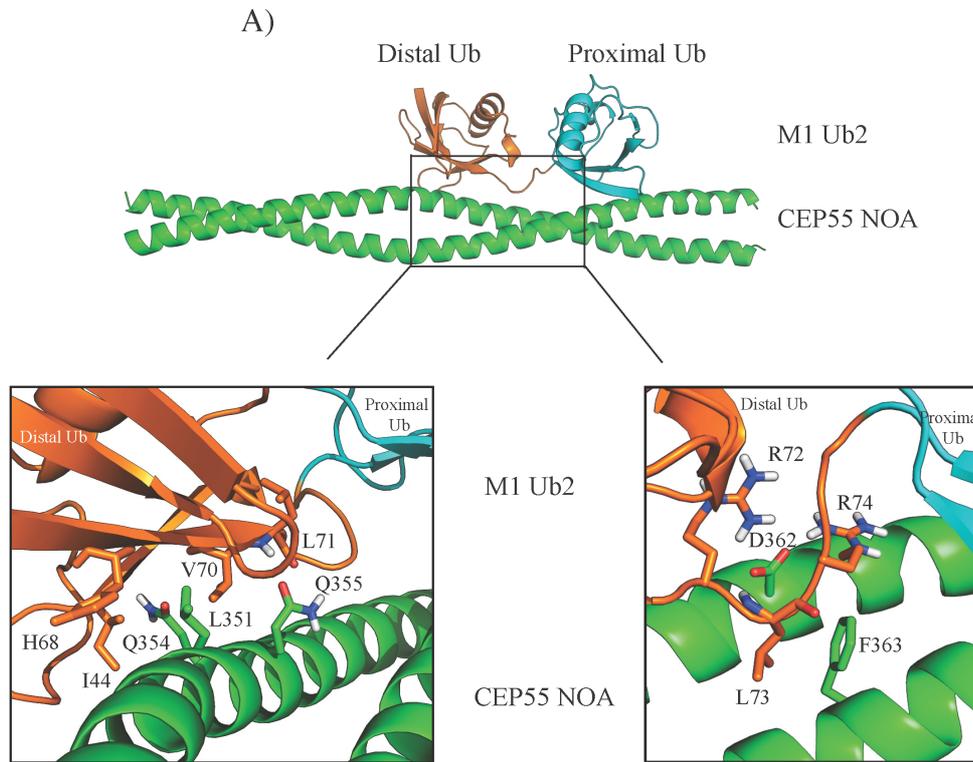


Figure 5: Structure-based identification of CEP55 NOA mutants defective in ubiquitin binding

A) Modelization of CEP55 NOA (green) in interaction with linear di-ubiquitin pointing out critical residues in the recognition of the distal ubiquitin (orange) - proximal ubiquitin (cyan). Zoom in the interface between distal ubiquitin and CEP55 NOA. Left: residues involved in the recognition of the hydrophobic patch of the distal ubiquitin. Right: residues involved in the recognition of the C-terminal tail of the distal ubiquitin.

B) Comparison of the association constants (K_A) of the different His-NOA mutants for linear tetra-ubiquitin measured by BLI. Curves are represented in FS6 (A-B-C).

FIGURE 5



B)

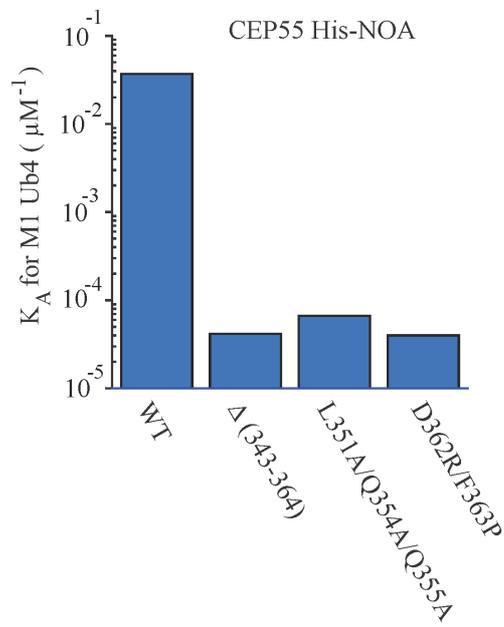


Figure 6: CEP55 NOA is not involved in CEP55 recruitment to the midbody but is absolutely required to ensure proper abscission

A) Recruitment to the midbody of HA-CEP55 WT and HA-CEP55 D362R/F363P. HeLa cells were concomitantly transfected with a non targeting (NT) or CEP55 siRNA and with an empty vector, or a CEP55 siRNA resistant vector encoding either HA-CEP55 WT or HA-CEP55 D362R/F363P. Cells were then stained with DAPI (blue) and immunolabeled with HA (yellow), MKLP-1 (red) and α -tubulin (cyan) antibodies. Insets show an expanded view of the midbody.

B) Relative quantification of CEP55 intensity at the midbody as indicated. Immunofluorescence experiments were the same as **(A)**. Upon MKLP-1 dots CEP55 intensity was normalized by MKLP-1 intensity at the midbody. The total number of midbodies (n) that results from three independent experiments is indicated.

(C-D) Effect of the double NOA mutant (D362R/F363P) on the ability to rescue cytokinesis defect induced by CEP55 depletion. Same immunofluorescence experiments as **(A)**. The percentage of cells connected by midbodies **(C)** and the percentage of multinucleated cells **(D)** were quantified. Representative images are shown in Figure S7A. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments and the total number of nuclei (n) counted in the 3 experiments is indicated. The level of CEP55 expression in the soluble fraction were controlled by Western Blot as indicated.

***p < 0.001 ; *p < 0.05 ; ns : not significant (p \geq 0.05)

FIGURE 6

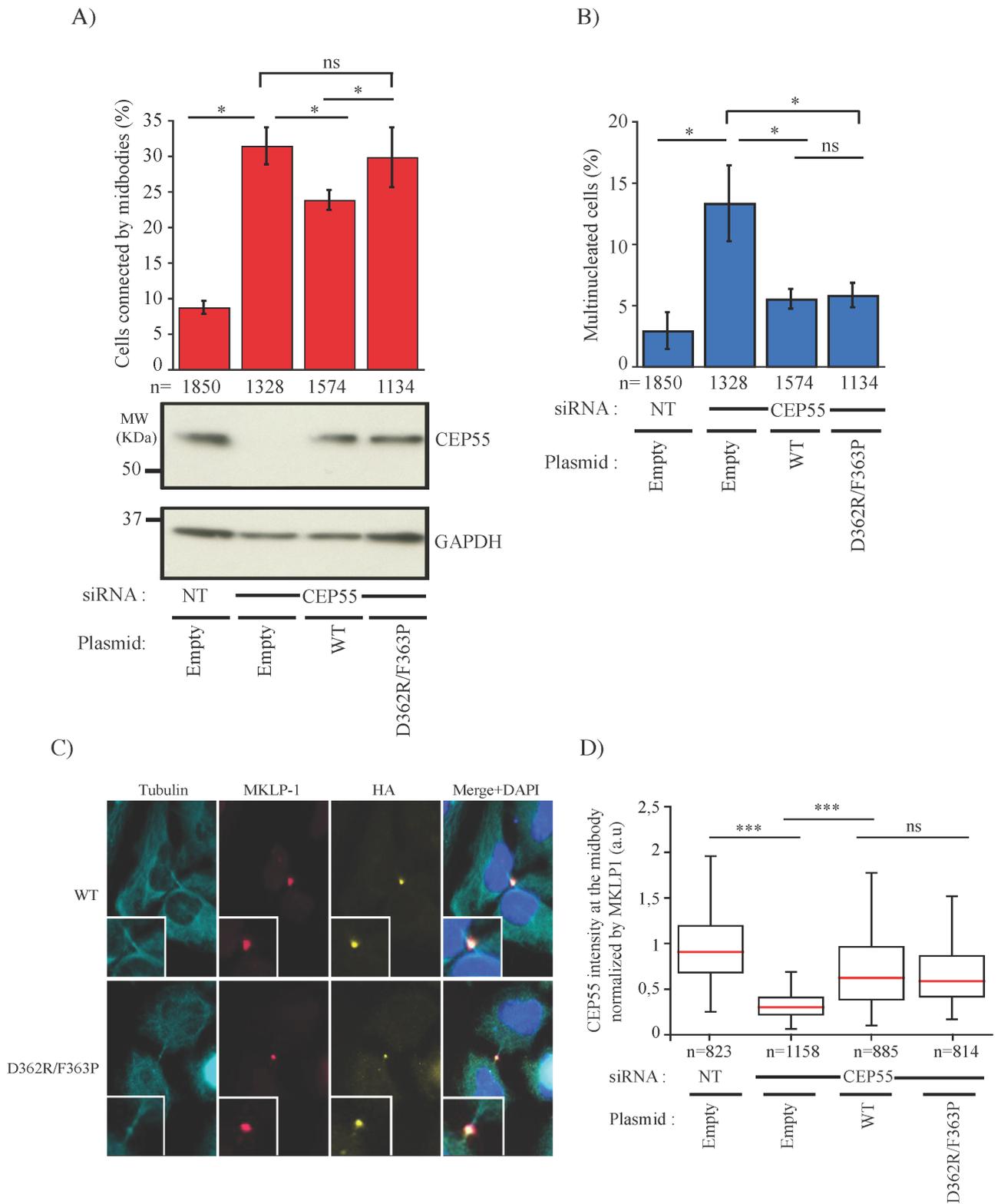


Figure 7: Ubiquitin binding activity of CEP55 UBZ is required to function as a specific cargo receptor to the midbody

(A) HeLa cells were transiently transfected with plasmids encoding for GFP alone or GFP-UBZ^{CEP55} and then analyzed by immunofluorescence and fluorescence microscopy. (B) Expression levels were controlled by Western-Blot. (C) Quantification of the percentage of co-localization between GFP or GFP-UBZ^{CEP55} and MKLP-1 (midbody reporter) in transfected cells. Data represent the mean \pm SD of six independent experiments. **p < 0.01.

(D) CRISPR-Cas9-mediated CEP55 knockout U2OS cell lines were transiently reconstituted following transfection with different plasmids encoding for either the WT, a debilitating double mutant unable to form a ZF structure (C440A/C443A) or the chimeric CEP55 proteins containing different UBZ groups as indicated (left panel and Figure S4). Reconstituted cells were then analyzed by immunofluorescence and the levels of expression controlled by Western-blot before quantifying the percentages of co-localization between CEP55 and MKLP-1 (midbody) for the indicated chimeric CEP55 proteins. Data represent the mean \pm SD of two independent experiments..

FIGURE 7

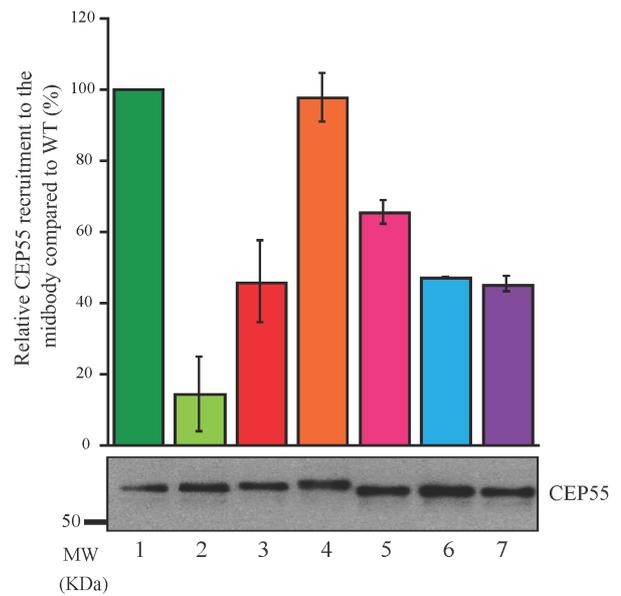
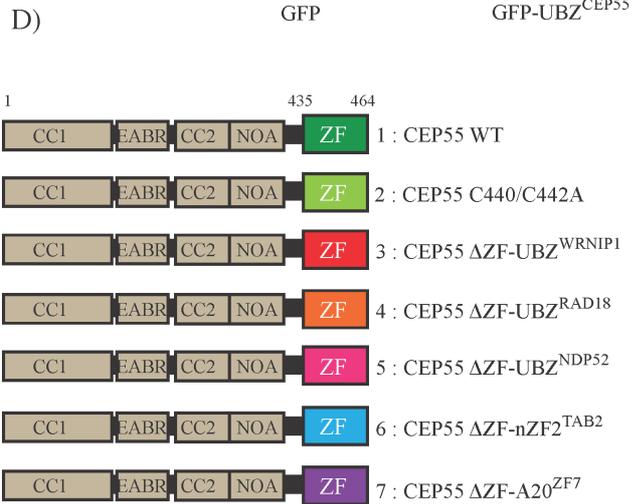
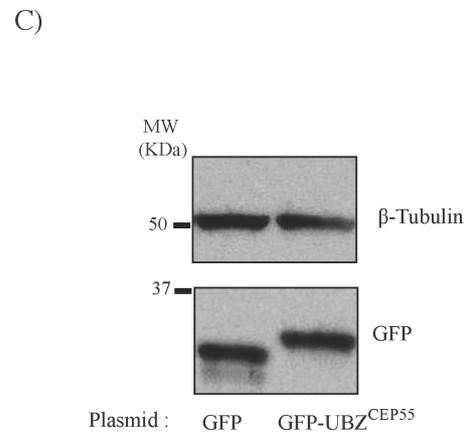
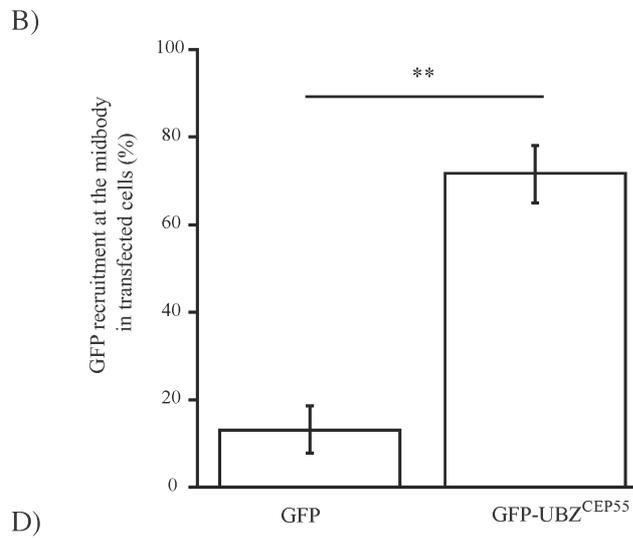
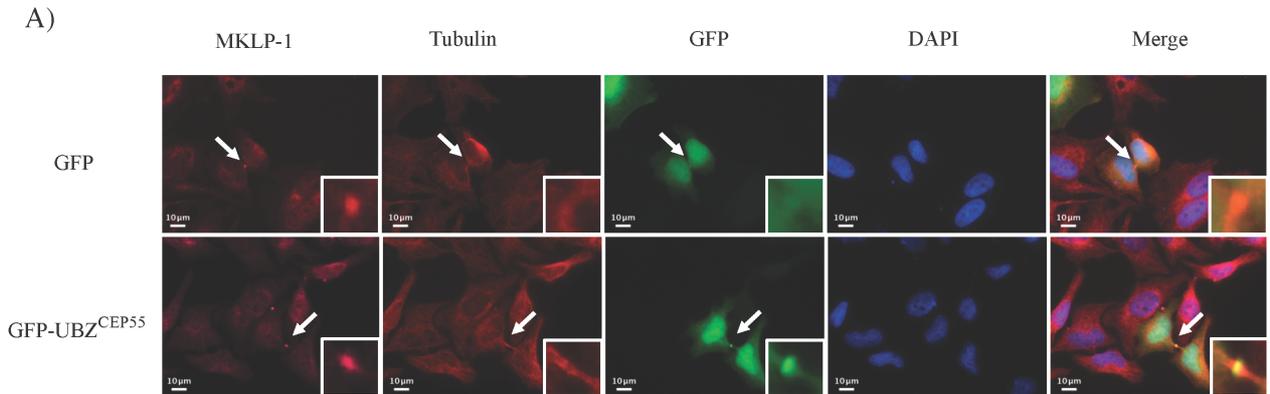


Table 1: Zn stoichiometries and internal FRET efficiencies from Tyr to Trp with or without zinc for ZF (W) WT and E460A peptides

The determination of internal FRET efficiencies and Zn stoichiometries of both peptides are described in the experimental procedures and the supplemental experimental procedures sections respectively.

TABLE 1

| | FRET efficiency (Tyr to Trp) | | | Zn stoichiometry |
|-------------|------------------------------|-------------------|---------------------------------------|------------------|
| | -Zn ²⁺ | +Zn ²⁺ | +Zn ²⁺ / -Zn ²⁺ | |
| ZF(W) WT | 0.28 ± 0.03 | 0.53 ± 0.03 | 1.9 ± 0.03 | 0.97 ± 0.24 |
| ZF(W) E460A | 0.37 ± 0.08 | 0.65 ± 0.05 | 1.8 ± 0.05 | 0.86 ± 0.04 |

SUPPLEMENTAL DATA (Text and Figures)

**CEP55 contains two novel NEMO-like ubiquitin domains
which play different roles in cytokinetic abscission**

Keïs Nabhane Said Halidi¹, Elisabeth Fontan¹, Alix Boucharlat¹, Laurianne Davignon¹,
Marine Charpentier¹, Robert Weil², Alain Israël³, Emmanuel Laplantine^{2*} and Fabrice Agou^{1*}

¹PlateForme de Criblage Chemogénomique et Biologique, Citech, Départements de Biologie Cellulaire et Infection et de Biologie Structurale et Chimie, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724, Paris CEDEX 15

²Laboratoire de Signalisation et Pathogénèse, Département de Biologie Cellulaire et Infection, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724, Paris CEDEX 15

³Unité de Signalisation Moléculaire et Activation Cellulaire, Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique URA 2582, Paris 75015, France

*Emmanuel Laplantine and Fabrice Agou are co-senior authors

Correspondence:

fabrice.agou@pasteur.fr; Ph: +33 (1) 44 38 95 69
emmanuel.laplantine.fr; Ph: +33 (1) 40 61 30 39

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids, ZF peptides, antibodies and siRNAs :

pET28 plasmids encoding human CEP55 WT His-NOA, Δ (343-364) His-NOA, L351A/Q354A/Q355A His-NOA and D362R/F363P His-NOA were purchased from GeneART (ThermoFisher scientific, MA USA). pcDNA3 plasmids (Invitrogen) encoding human HA-CEP55 WT (1-464), HA-CEP55 D362R/F363P, HA-CEP55 C440A/C443A, HA-CEP55 E460A, HA-CEP55 CEP55 D362R/F363P/C440A/C443A and the pGEX4T2-di-Ub and tetra-Ub-plasmid (GE Healthcare) encoding linear di- and tetra-ubiquitin were prepared using conventional molecular cloning and PCR mutagenesis methods. pcDNA3 plasmids encoding the human His-strep-CEP55 WT (1-464), His-strep-CEP55 C440A/C443A, His-strep-CEP55 Δ ZF-UBZ^{WRNIP1}(15-53), His-strep-CEP55 Δ ZF-UBZ^{RAD18} (201-240), His-strep-CEP55 Δ ZF-UBZ^{NDP52}(440-470), His-strep-CEP55 Δ ZF-nZF2^{TAB2} (665-693) and His-strep-CEP55 Δ ZF-A20^{ZF7}(759-790), were purchased from Eurofins Genomics (France-Germany). pEGFP-C1 plasmid (Clontech) encoding GFP-ZF^{CEP55} was purchased from Eurofins Genomics (France-Germany). A pET52b3C/LIC plasmid (Merck Millipore) encoding Strep-Tag-II- tagged human ubiquitin-conjugating enzyme E2-25K-C170S was prepared by Ligation Independent Cloning following the manufacturer's instructions. pGEX-Ubc13 (18894) and pET16b- Mms2 (18893) were provided by Addgene (Cambridge, MA).

WT and E460A CEP55 ZF (W) (residues 435-464), Strep-Tag-II CEP55 ZF and N-terminal fluorescein-labeled-CEP55 ZF peptides (CEP55 F-ZF) (>95% purity) were purchased from Covalab (Villeurbanne, France).

Antibodies against the following proteins were used : anti- β -tubulin (T4026, Sigma), anti- α -tubulin (Homemade, Institut Curie), anti-CEP55 (sc-374051, Santa Cruz), anti MKLP-1 (sc-867, Santa Cruz), anti-GAPDH (sc-59540, Santa Cruz), anti-Alix (3A9, Cell Signaling), anti-TSG101(4a10, GeneTex), anti-HA II and anti-GFP. CEP55 siRNA (SI02653021, Qiagen) and Non-targeting (D-001810-10, Dharmacon) were used.

Purification of various proteins and ubiquitin expression

Protein purification of all the proteins was carried out on a ÄKTA Prime Purifier (Amersham Pharmacia Biotech). Ubc13, linear di-ub and tetra-Ub expressed as a glutathione-S-transferase (GST) fusion protein, StrepTagII-E2-25K-C170S, His-Mms2 were purified and Lys-63 di-Ub, Lys-63 and Lys-48 tetra-Ub were enzymatically produced as previously described in [146]. Commercial available K11 tetra-ub (Lifesensor) was used. His-Darpin was

purified as described in [552]. NEMO His-NOA and WT/mutants CEP55 His-NOA were purified from insoluble bacterial extracts and solubilized by 8M urea in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1M NaCl, 0.5 mM TCEP. Proteins were directly renatured on the Ni-NTa resin (Qiagen) by applying a reverse, linear urea gradient (8 to 0 M urea) before being eluted in 1M imidazol and dialysed against a 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.2 mM TCEP buffer. WT CEP55 GST-NOA was purified from insoluble bacterial extracts and solubilized at room temperature by 10 % Sarkosyl in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP. The Sarkosyl was then diluted (2%) in a 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP, 30 mM CHAPS, 3% Triton X100 and the protein was purified with glutathione Sepharose 4B column (GEHealthcare) according to the manufacturer's instructions. The protein was then dialyzed against a 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 0.1 mM TCEP, 0.5 DDM buffer. After purification, all proteins were concentrated and stored at -80 °C.

Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) experiment was carried out with an Aviv 215 polarimeter (Aviv Instruments, Lakewood, NJ), with a 20 mm path-length parallelepipedic quartz cell. Before analysis, the purified His-NOA was extensively dialyzed against a TrisHCl 25 mM, pH 7.5, NaCl 150mM, TCEP 1 mM, NaF 200 mM buffer and its concentration was adjusted to 20 μ M. The exact concentration was determined after the CD experiment, by amino-acid analysis. Far-UV CD spectrum was recorded at room temperature, from 185 to 260 nm, at 1 nm intervals, and the spectrum generated is the mean of three scans minus the mean of three scans of the reference buffer. Data were normalized as follows: $\theta_{norm} = \theta / (L_p \times 3298 \times 10 \times L_c \times C)$, where θ_{norm} is the normalized CD signal, θ is the CD signal before normalization (mdegrees), L_p is the number of peptide bonds, L_c is the path length and C the molar concentration of protein. The α -helical content of each protein was determined from the CD signal at 222, 208 and 191 nm, by the equation $\%H = ((\theta_{norm} - \theta_{0\%}) / (\theta_{100\%} - \theta_{0\%})) \times 100$ where $\theta_{0\%}$ and $\theta_{100\%}$ are signals of reference peptides at 0 and 100% of helicity respectively.

Size exclusion chromatography - multi angle light scattering (SEC-MALS) analysis

The analysis were carried out on a ÄKTA purifier on a column of gel-filtration Superdex 200 (GE-Healthcare) coupled to a multi angle light scattering detector DAWN-HELEOS and a refractometer Optilab rEX (Wyatt Technology, USA) at room temperature.

The WT, Δ (343-364), L351A/Q354A/Q355A, D362R/F363P His-NOA were filtered on 0.22 μM filters in TrisHCL 20 mM, pH 7.5, NaCl 600mM, DTE 0.2 mM and 500μl of each protein (20 μM) were injected. Unicorn software was used to pilot the size exclusion chromatography and ASTRA VI. The normalization of the peaks and the band broadening were performed using Bovin Serum Albumin. Toluene was used to calibrate the 90° scattered light.

SDS-PAGE in reducing or non-reducing conditions

Sample buffer (4X) containing or not 100 mM DTT was added to 3 μg of CEP55 WT, Δ (343-364), L351A/Q354A/Q355A, D362R/F363P His-NOA in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 0.2 mM TCEP. Samples were boiled during 10 min and analysed by SDS-PAGE.

Fluorescence Spectroscopy and determination of internal FRET efficiency

Fluorescence measurements for both WT and E460A ZF (W) peptides were recorded on a PTI multimodular QuantaMaster spectrofluorimeter (PTI, Lawrenceville, NJ) at room temperature. The peptides (300μM) were folded in 50mM Tris HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 μM TCEP, 2mM ZnCl₂ and then dialysed against the same free ZnCl₂ buffer to remove ZnCl₂ excess. Emission spectra (300-450 nm) of the folded and unfolded peptides (2μM) were measured at an excitation wavelength of 280 nm exciting both the tyrosines and the tryptophan. Emission spectra from dialysis buffer were subtracted to the spectra obtained.

To determine the internal FRET from tyrosines to tryptophan into the folded and unfolded ZF (W) peptides, the tryptophan emissions (350 nm) and the absorbances of the peptides (5 μM) at 275, 285 and 290 nm were measured. The experimental tryptophan quantum yields (Q_{exp}) were calculated for the 3 wavelengths. The experimental relative tryptophan quantum yields ($Q_{r_{exp}}$) were then obtained by the relation $Q_{r_{exp}}(\lambda_{ex}) = Q_{exp}(\lambda_{ex}) / Q_{exp}(\lambda_{ex=290nm})$ assuming that at 290 nm the absorbance of tyrosines are negligible compared to tryptophan's. The theoretical relation used to determine the FRET efficiency is $Q_{r_T}(\lambda_{ex}) = F_{trp}(\lambda_{ex}) + E \times F_{tyr}(\lambda_{ex})$ [553] with E the FRET efficiency, $Q_{r_T}(\lambda_{ex})$ the theoretical relative tryptophan quantum yield, $F_{trp}(\lambda_{ex})$ and $F_{tyr}(\lambda_{ex})$ the theoretical fractional absorbances of tryptophan and tyrosine respectively for a 1Trp/2tyr ratio, at a fixed excitation wavelength (λ_{ex}). $F_{trp}(\lambda_{ex})$ and $F_{tyr}(\lambda_{ex})$ were determined using molar extinction coefficients of tyrosine and tryptophan ϵ_{tyr} and ϵ_{trp} available online <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/091.html> and <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/092.html> respectively [554] as the following equation: $F_{tyr}(\lambda_{ex}) = 2 \times \epsilon_{tyr}(\lambda_{ex}) / (2 \times \epsilon_{tyr}(\lambda_{ex}) + \epsilon_{trp}(\lambda_{ex}))$ and $F_{trp}(\lambda_{ex}) = \epsilon_{trp}(\lambda_{ex}) / (2 \times$

$\epsilon_{\text{tyr}}(\lambda_{\text{ex}}) + \epsilon_{\text{trp}}(\lambda_{\text{ex}})$). The experimental relative tryptophan quantum yields ($Q_{\text{r,exp}}$) were then reported on the $Q_{\text{r,T}}(\lambda_{\text{ex}})$ curves (not-shown) and the FRET efficiency from tyrosines to tryptophan into the peptides were determined.

To estimate the affinity of CEP55 ZF(W) WT and E460A for zinc, each peptide was titrated adding increasing concentrations of ZnCl_2 at an excitation and an emission wavelength of 280 and 342 nm respectively. Data were fitted using a quadratic equation as followed: $X_{\text{bound}} = (K_{\text{D}} + n \times C_{\text{p}} + C_{\text{Zn}} - ((K_{\text{D}} + n \times C_{\text{p}} + C_{\text{Zn}})^2 - 4n \times C_{\text{p}} \times C_{\text{Zn}})^{1/2}) / 2n \times C_{\text{p}}$ where X_{bound} is the peptide fraction bound to zinc, C_{p} and C_{Zn} the total peptide and zinc concentrations, K_{D} and n the dissociation constant and the stoichiometry of the peptide-zinc complex. X_{bound} was determined by the following equation: $X_{\text{bound}} = (F_{\text{obs}} - F_0) / (F_{\text{max}} - F_0)$ where F_{obs} is the observed fluorescence, F_0 and F_{max} the fluorescence in absence and in presence of saturating concentration of zinc respectively.

Fluorescence polarization experiments

Fluorescence polarization (FP) experiments measurements were recorded on a Tecan microplate reader infiniteR F500 (Tecan France S.A.S) at 25°C using a 485-nm excitation filter and a 535-nm emission filter in a binding buffer (Tris HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150mM, TCEP 0.1 mM, DDM 0.2mM) in the presence or absence of 1mM ZnCl_2 . The fluorescein labelled peptides WT and E460A F-ZF (0,5 μM) were titrated with increasing concentrations of mono-ubiquitin from 0 to 1000 μM . To assess non specific binding, similar experiments were performed in the absence of ZnCl_2 with unfolded peptides. Under the latter conditions the deviations of the FP signals, which vary linearly with ubiquitin concentration, can be fitted according to a linear function with slopes of 0.04 and 0.02 mP/ μM for WT and E460A F-ZF respectively. This non specific component was subtracted from the FP data obtained in presence of ZnCl_2 . Curve fitting of the FP data was then done by nonlinear regression using the equation $P_{\text{obs}} = (P_{\text{max}} - P_0) \times \text{Ubi} / (K_{\text{D}} + \text{ubi}) + P_0$ to solve the dissociation constant K_{D} given P_{obs} (Polarization at a given concentration of ubiquitin), P_{max} (polarization after saturation with ubiquitin), P_0 (polarization in the absence of ubiquitin), Ubi (ubiquitin concentration). To check the contribution of ZnCl_2 in the binding between F-ZF peptide and ubiquitin, the same experiment was performed with a pre-folded ZF WT in the absence of ZnCl_2 in the binding assay. The peptide was pre-folded in TrisHCL 50 mM, pH 7.5, NaCl 150mM, TCEP 0.1 mM, ZnCl_2 10 mM and dialysed against the same free ZnCl_2 buffer to remove ZnCl_2 excess. The same protocol was applied to the unfolded WT F-ZF without

ZnCl₂. The folded and unfolded peptides were then titrated by ubiquitin. A similar K_D than for the condition containing ZnCl₂ in the binding buffer was obtained (data not-shown).

CEP55 F-ZF WT titration by Lys-63 di-ubiquitin (0-500 μM) was performed in 0.2 mM ZnCl₂. An isodesmic increase of fluorescence polarization was observed for high concentration of ubiquitin (100-500 μM) and the contribution of this non specific binding (N_s) was estimated using $P_{obs} = (P_{max} - P_0) \times Ubi / (K_D + ubi) + N_s \times Ubi + P_0$. This non specific component (N_s) was then subtracted to the data and the curve was fitted as for mono-ubiquitin titration.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Ngadjewa, F., et al., *Two-sided ubiquitin binding of NF-kappaB essential modulator (NEMO) zinc finger unveiled by a mutation associated with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency syndrome*. J Biol Chem, 2013. **288**(47): p. 33722-37.
2. Wyler, E., et al., *Inhibition of NF-kappaB activation with designed ankyrin-repeat proteins targeting the ubiquitin-binding/oligomerization domain of NEMO*. Protein Sci, 2007. **16**(9): p. 2013-22.
3. Eisinger, J., *Intramolecular energy transfer in adrenocorticotropin*. Biochemistry, 1969. **8**(10): p. 3902-8.
4. Dixon, J.M., M. Taniguchi, and J.S. Lindsey, *PhotochemCAD 2: a refined program with accompanying spectral databases for photochemical calculations*. Photochem Photobiol, 2005. **81**(1): p. 212-3.

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1: CEP55 contains two NOA and UBZ ubiquitin binding domains (UBDs) in its C-terminal part, which are similar to the NEMO protein (associated with Figure 1A) :

A) Multiple sequence alignment of CEP55 and NEMO from different organisms showing the degree of conservation of NOA (also called UBAN/CC2-LZ/CoZi/NUB) and UBZ UBD domains in each protein. Sequences were aligned with CLUSTAL Omega using software Jalview 2.10.1. The NOA and UBZ UBDs are boxed in red and blue, respectively. The conserved residues are highlighted by the default colour scheme in Clustal X and zinc-ion-coordinating residues are indicated by asterisk on the bottom of the sequence. **B)** Schematic representation of the coiled-coil prediction of human CEP55 by Paircoil 2 program. The region corresponding to the NOA and EABR (ESCRT and ALIX Binding Region) domains are indicated. **C)** Structural model of the dimeric coiled-coil NOA of CEP55 generated by homology modeling using the human NEMO NOA domain as template (PDB ID: 4BWN). **D)** Structural model of CEP55 ZF generated by homology modeling using ZF NEMO as template (PDB ID: 2JVX). The Zn²⁺ ion is depicted as a grey sphere.

FIGURE S1

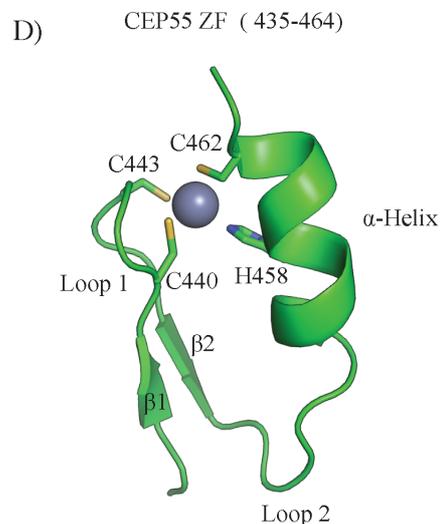
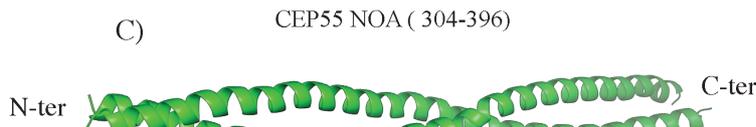
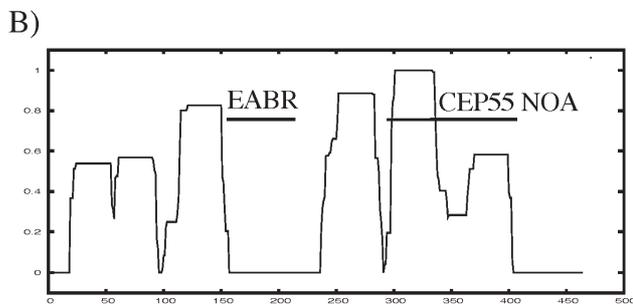
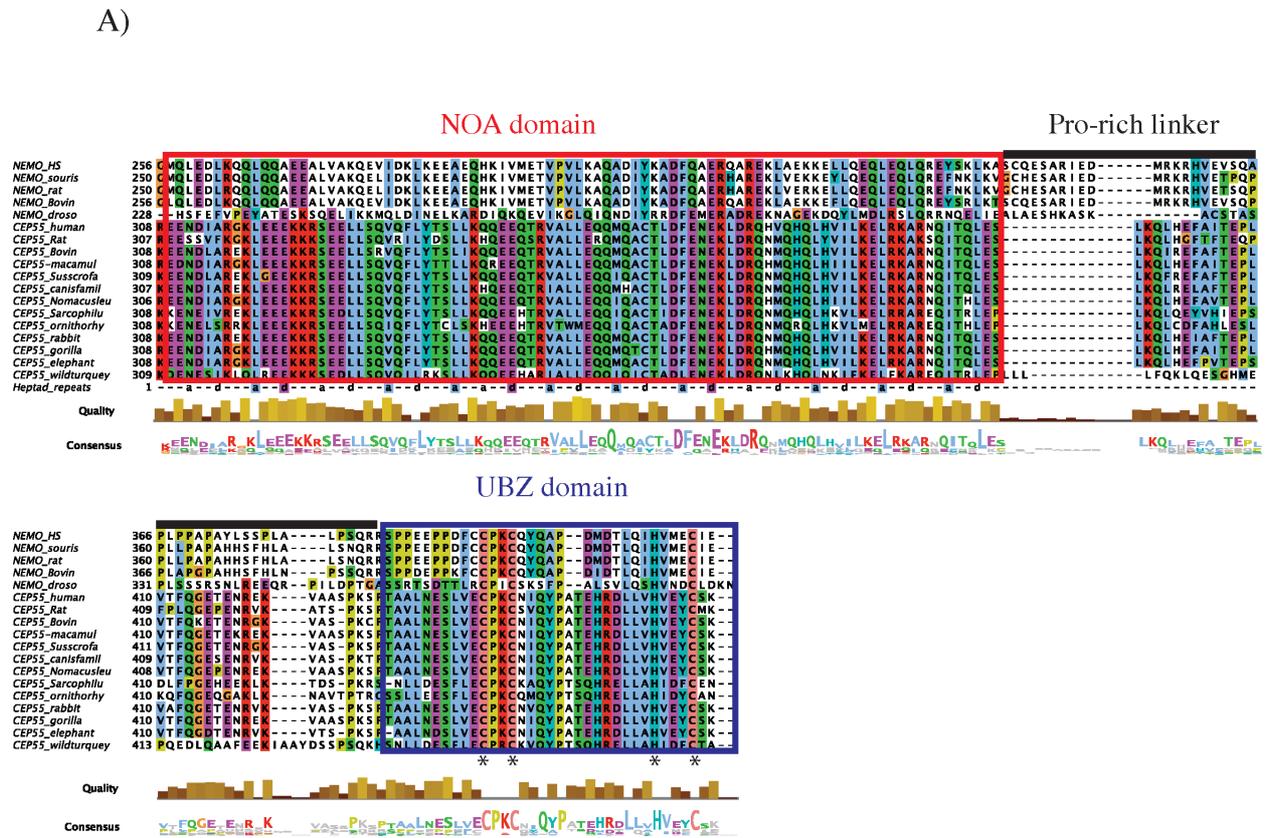


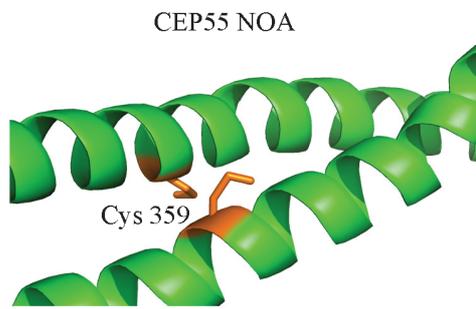
Figure S2: related to Figure 1C

A) Structural model of CEP55 NOA model (green) showing that the Cys359 residues (orange) of each monomer are in close proximity when the domain forms a dimeric coiled-coil structure. The Cys359 residue depicted as a stick model corresponds to [d] position in the seven-residue heptad repetition of parallel dimeric coiled-coil and so contributes to the dimeric core and packing of two α -helices in the dimer.

B) SDS-PAGE analysis of purified CEP55 His-NOA under reducing or non-reducing conditions showing that each Cys359 is able to form a reversible disulfide bound between each monomer in the dimer.

FIGURE S2

A)



B)

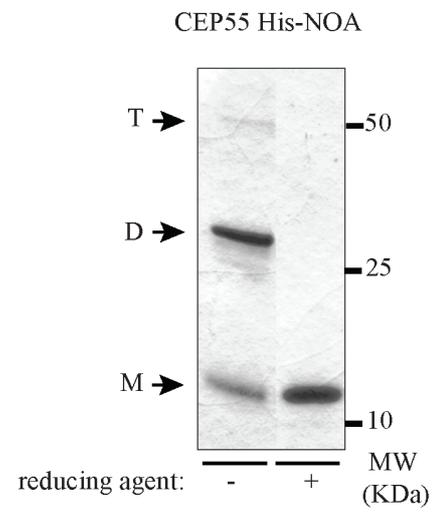
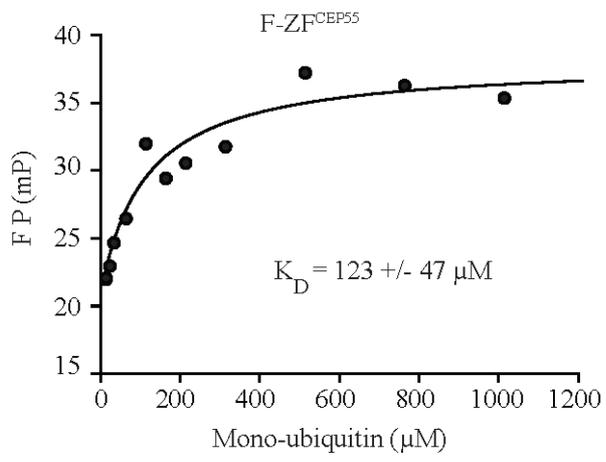


Figure S3: related to Figure 2

Quantitative ubiquitin binding of CEP55 ZF with mono-ubiquitin (**A**) or a K63 di-ubiquitin chain (**B**) in solution monitored by fluorescence polarization. Fluorescein labeled ZF^{CEP55} noted F-ZF (0.5 μ M) was titrated with increasing concentrations of mono-ubiquitin (0-1000 μ M) or K63 di-ubiquitin (0-500) μ M

FIGURE S3

A)



B)

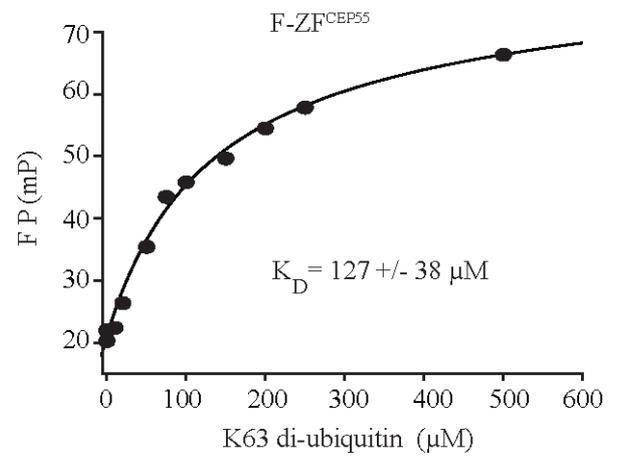


Figure S4: The CEP55 ZF displays the highest homology with the RAD18/WRNP1 UBZ group, suggesting a similar ubiquitin binding mode

A) Structure-based sequence alignment of CEP55 ZF with different UBZs classified into at least 4 different UBZ groups according to their mode of ubiquitin recognition. The sequences of human NDP52 (also called CALCOCO2) and human Pol η were aligned, based on their 3D structures. Zinc-ion-coordinating residues are highlighted in blue, whereas those that interact with ubiquitin in the complex structure of WRNP1/RAD18, FAAP20/pol η and NDP52 groups are indicated by yellow, green and magenta inverted triangles on the top of each sequence, respectively. The secondary structure elements of CEP55 ZF are illustrated as tubes for α -helices and arrows for β strands above the sequence. **B)** comparison of crystal complexes of different UBZ groups with ubiquitin. Superposition of UBZ structures of WRNP1 (PDB ID: 3VHT), FAAP20 (PDB ID: 3WWQ) and NDP52 (PDB ID: 4XKL) alone (left) or in complex with ubiquitin (right). In each UBZ, the Zn²⁺ ion is depicted as a red sphere. For clarity, only the distal ubiquitin of K63-Ub₂ is shown with the complex FAAP20:K63-Ub₂. Color scheme is the same as (A). **C)** left, sequence alignment of CEP55 ZF from different organisms with human members of the WRNP1/RAD18 group. Sequences were aligned using CLUSTAL OMEGA. The highly and partially conserved residues are indicated by heavy and light red-shaded boxes, respectively. Right, comparison of crystal and NMR solution structure of WRNP1 (PDB ID: 3VHT, in grey) and RAD18 (PDB ID: 5VF0, in black) in complex with monoubiquitin (orange (WRNP1) and green (RAD18)). The strictly conserved Asp/Glu residue making a significant binding hot spot with ubiquitin (Arg 42) and located in the C-terminal of α -helix is shown as a stick model in red.

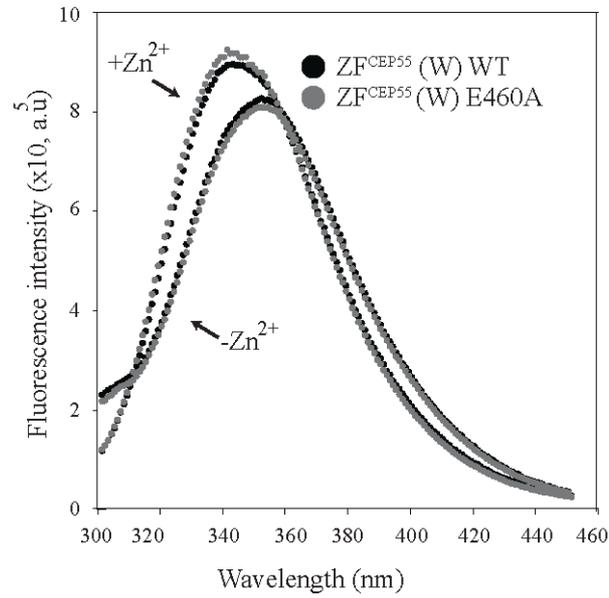
Figure S5: related to Figure 3

A) Fluorescence emission spectra of WT (black) and E460A mutant (gray) CEP55 ZF (W) peptides ($10 \mu\text{M}$) in presence or in absence of zinc ion at an excitation wavelength of 280 nm.

B) Titration of the E460A F-ZF^{CEP55} (W) mutant peptide ($0.9 \mu\text{M}$) using increasing zinc concentrations ($0.1\text{-}1.2 \mu\text{M}$) at an excitation and emission wavelengths of 280 and 347 nm, respectively. Error bars represent the standard deviation of the fluorescence measurements of each titration point for 5 min.

FIGURE S5

A)



B)

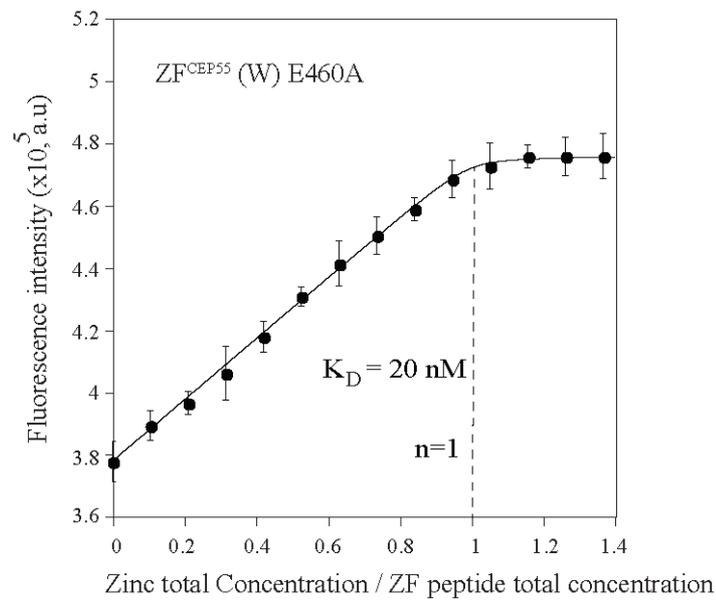


Figure S6: related to Figure 4

A) HeLa cells were concomitantly transfected with a non targeting (NT) or CEP55 siRNA and with an empty vector, or a CEP55 siRNA resistant vector encoding either HA-CEP55 WT, HA CEP55 C440A/C443A or HA-CEP55 E460A. Cells were then fixed with DAPI (blue), MKLP-1 (red) and β -tubulin (cyan) antibodies. Arrows and stars represent cells connected by a midbody and multinucleated cells, respectively. Image Quantification is depicted in Figure 4 (C-D). **B)** Analysis of the ZF mutant ability to rescue the defect in midbody remnant clearance induced by CEP55 depletion. The images shown in (A) were used to quantify the percentage of midbody remnant by cell as described in the experimental procedures. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments and the total number of nuclei (n) counted in the 3 experiments is indicated.

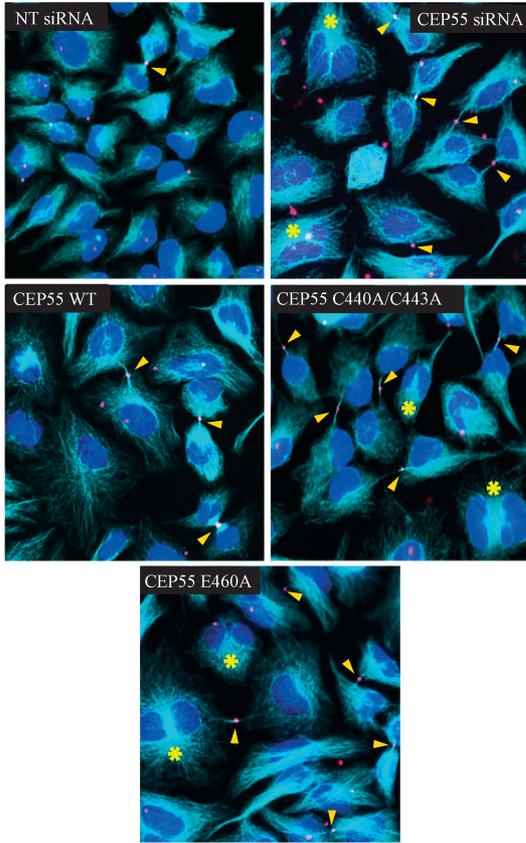
C) The level of expression of CEP55 in the insoluble fraction of the Western-Blot shown in F4 was also controlled showing a similar level of expression between the different ectopic proteins, which are mainly expressed in the insoluble fraction.

D) Quantification of ALIX intensity at the midbody under different experimental conditions. Cells were stained with DAPI, ALIX, MKLP-1 and β -tubulin antibodies. Upon MKLP-1 dots, ALIX intensity was normalized by MKLP-1 intensity at the midbody. The total number of midbodies (n) detected is indicated.

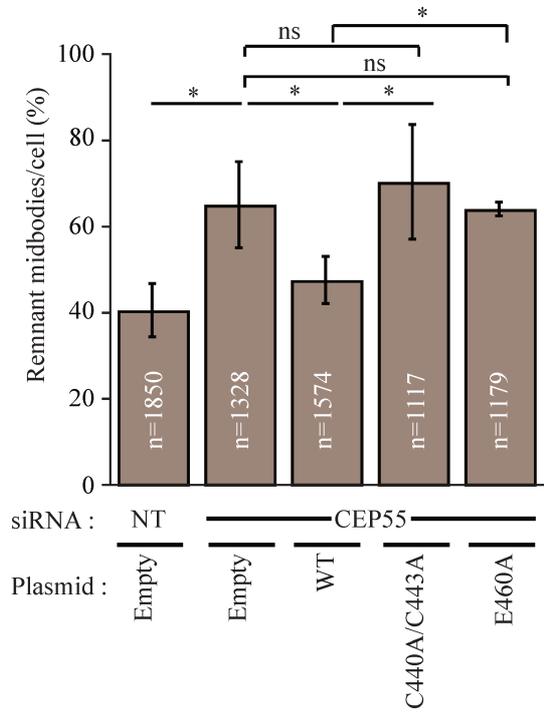
*** $p < 0.001$; * $p < 0.05$; ns : not significant ($p \geq 0.05$)

FIGURE S6

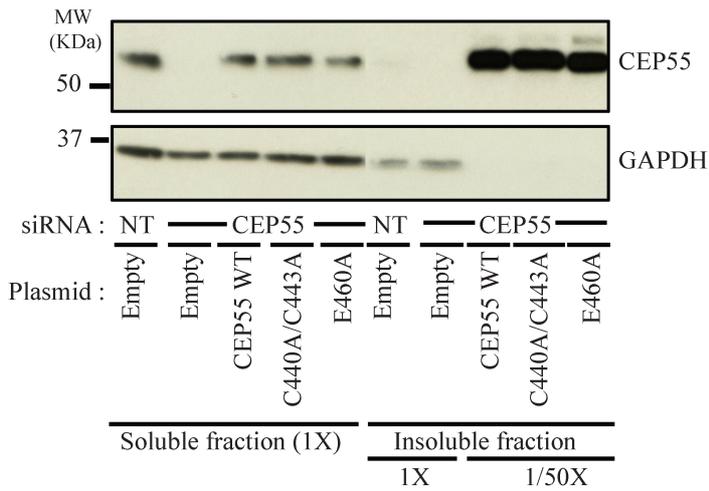
A)



B)



C)



D)

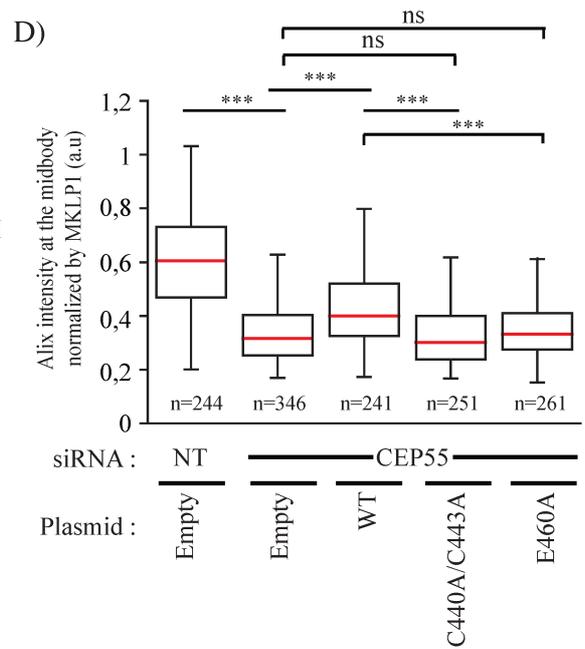
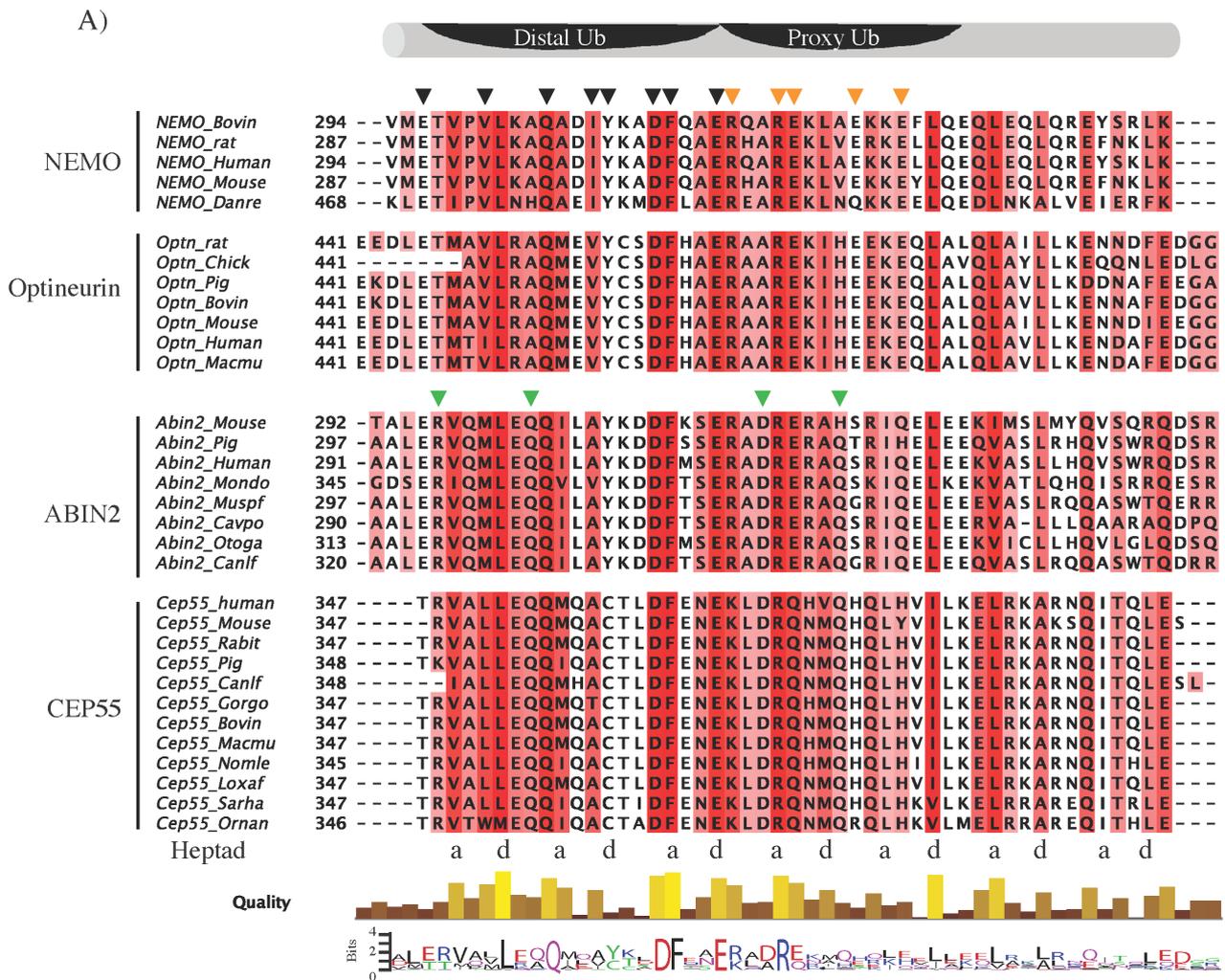


Figure S7: Comparison of CEP55 NOA UBD with those of NEMO, Optineurin and ABIN2

A) Structure-based alignment of CEP55 NOA with NEMO, OPTINEURIN and ABIN2 from different species. Sequences were aligned with CLUSTAL Omega using software Javview 2.10.1. The completely and partially conserved residues are highlighted by heavy and light red shaded boxes, respectively. The residues which are important for the NOA domain and distal ubiquitin of M1-Ub₂ (Distal UB) are indicated by black inverted triangles, whereas those that make specific contacts with the proximal ubiquitin (Proxy Ub) by magenta inverted triangles. The residues that are only conserved in ABIN2 and CEP55 families and that are important for both proximal and distal ubiquitin binding are indicated by green inverted triangles above the ABIN2 sequences. Letters immediately below the alignment indicate conserved residues in the a and d positions involved in the hydrophobic core of parallel coiled coil dimer structures of NEMO, OPTINEURIN and ABIN2. In this alignment, note that residues previously shown as specifically involved in the linear linkage of M1-Ub₂ and proximal ubiquitin binding are not strictly conserved in CEP55 family. Indeed, the five Ub-interacting residues of NEMO NOA (*i.e.* Arg316, Arg319, Glu320, Glu324 and Glu327) are not conserved or replaced by a functionally equivalent residue in CEP55 NOA (*i.e.*, Lys367, Arg370, Gln371, His372 and His375). **B)** The NOA UBD of NEMO, Optineurin and ABIN2 exhibit a conserved mode of recognition to a linear di-ubiquitin chain. Structural comparison of crystal complexes of different NOA domains in complex with a linear Ub₂ chain, showing a conserved linear di-ubiquitin binding mode. Root mean square differences (rmsd) between the superimposed NOA domain of NEMO in grey (PDB ID 2ZVO), OPTINEURIN in orange (PDB ID: 5B83) and ABIN2 in magenta (PDB ID 5H07) are indicated. The number of aligned atoms is indicated in parentheses.

FIGURE S7



B)

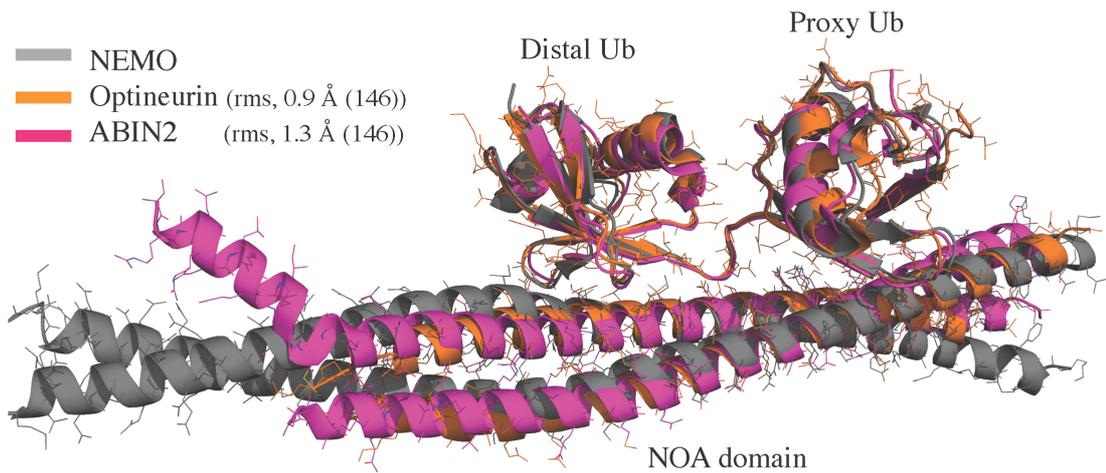


Figure S8 related to Figure 5: Ubiquitin binding affinity and dimer stability of CEP55 His-NOA and its three mutants

Quantification of ubiquitin binding activity by biolayer interferometry (BLI) of His-NOA $\Delta(343-364)$ (**A**), His-NOA L531A/Q354A/Q355A (**B**) and His-NOA D362R/F363P mutants (**C**) with a linear tetra-ubiquitin chain (2.5-5 μM). His-NOA mutants (8 μM) were immobilized on anti-penta-his biosensors in all experiments.

D) SDS-PAGE analyses of purified CEP55 His-NOA WT and its mutants under reducing or non-reducing conditions. Note that the His-NOA $\Delta(343-364)$ mutant, which has an internal deletion from residues 343-364, lacks the Cys359 residue and was then used as a negative control.

E) Analysis of CEP55 His-NOA WT and its mutants by size exclusion chromatography coupled with multi angle light scattering (SEC-MALS). None of the mutants is able to dimerize and oligomerize under these experimental conditions (reducing conditions). M: first monomer species, M': second monomer species with a higher frictional coefficient compared to M (same molecular mass but different hydrodynamic properties), D : dimer, H :Hexamer .

FIGURE S8

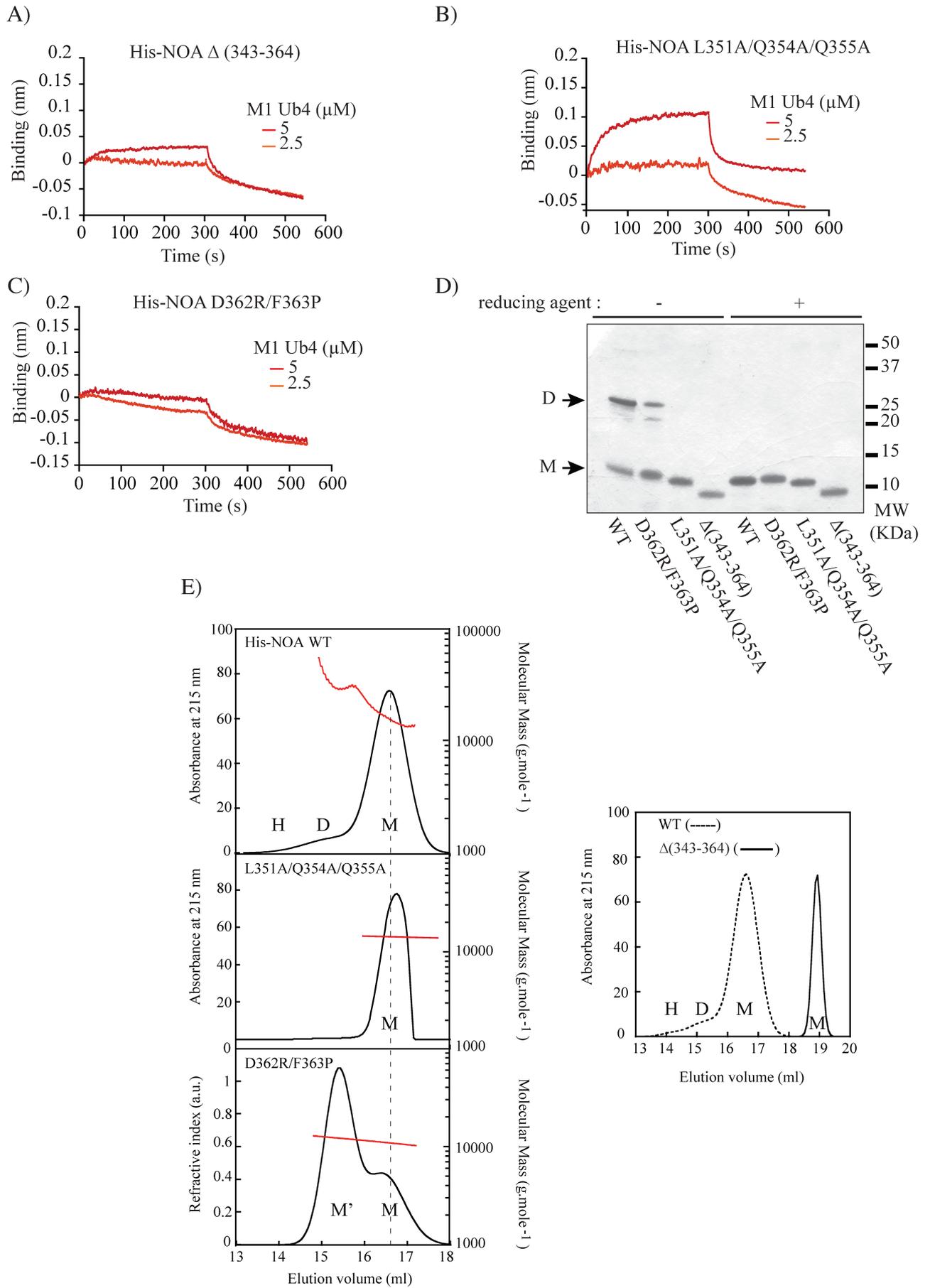


Figure S9 related to Figure 6: CEP55 NOA is not involved in CEP55 recruitment to the midbody, but is absolutely required to ensure proper abscission.

HeLa cells were concomitantly transfected with a non targeting (NT) or CEP55 siRNA and with an empty vector, or a CEP55 siRNA resistant vector encoding HA-CEP55 WT or HA-CEP55 D362R/F363P.

A) Cells were fixed with DAPI (blue), MKLP-1 (red) and β -tubulin (cyan) antibodies. Arrows and stars represent cells connected by a midbody and multinucleated cells, respectively. Quantification is represented in Figure 6 (C-D).

B) Analysis of the D362R/F363P mutant ability to rescue midbody remnant clearance defect induced by CEP55 depletion. The exact same images as in (A) were used to quantify the percentage of midbody remnant by cell as described in the experimental procedure. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments and the total number of nuclei (n) counted in the 3 experiments is indicated.

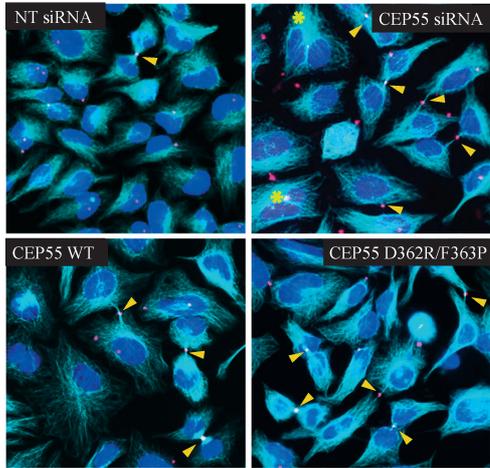
C) Level of protein expression in the different conditions in the soluble and insoluble fraction in F6 was analyzed by Western blot showing a similar level of expression between the different ectopic proteins, which are mainly expressed in the insoluble fraction.

D) Quantitative analysis of ALIX intensity at the midbody in different conditions as indicated. Cells were stained with DAPI, ALIX, MKLP-1 and β -tubulin antibodies. Upon MKLP-1 dots, ALIX intensity was normalized by MKLP-1 intensity at the midbody. The total number of midbodies (n) detected is indicated.

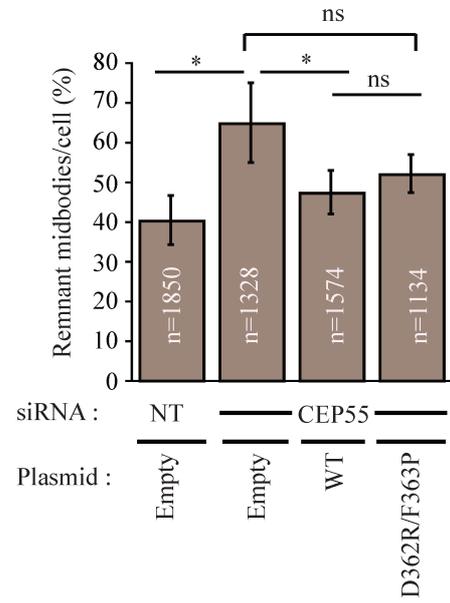
***p < 0.001 ; *p < 0.05 ; ns : not significant (p \geq 0.05)

FIGURE S9

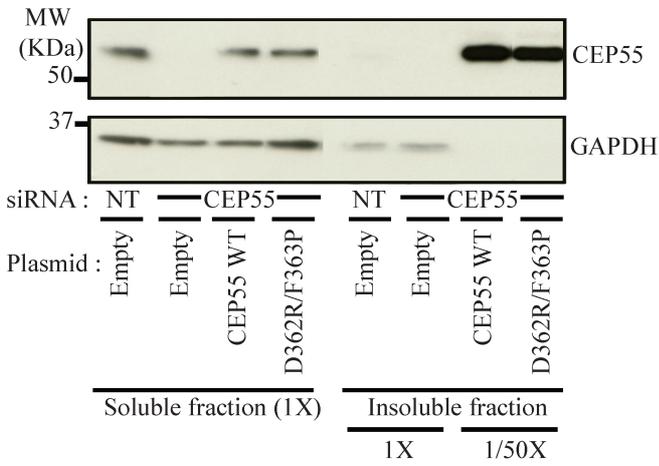
A)



B)



C)



D)

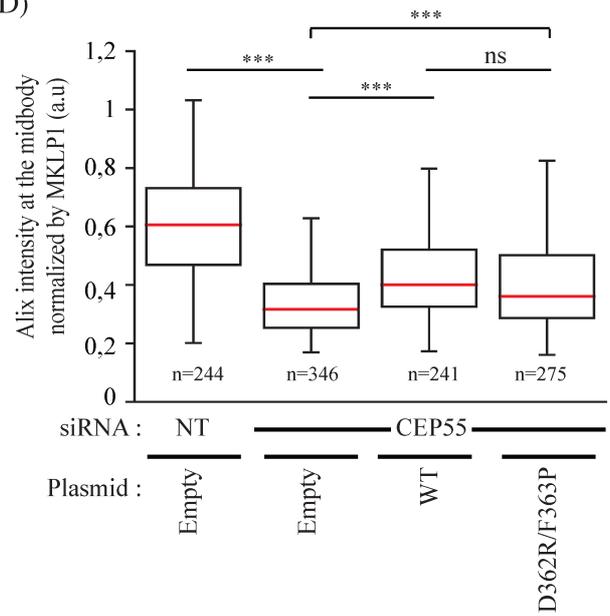
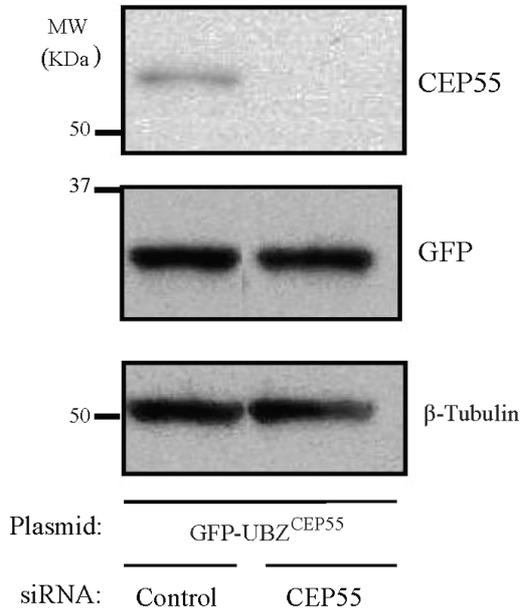


FIGURE S10 related to Figure 7: The cargo receptor activity of GFP-ZF to the midbody is independent on endogenous CEP55

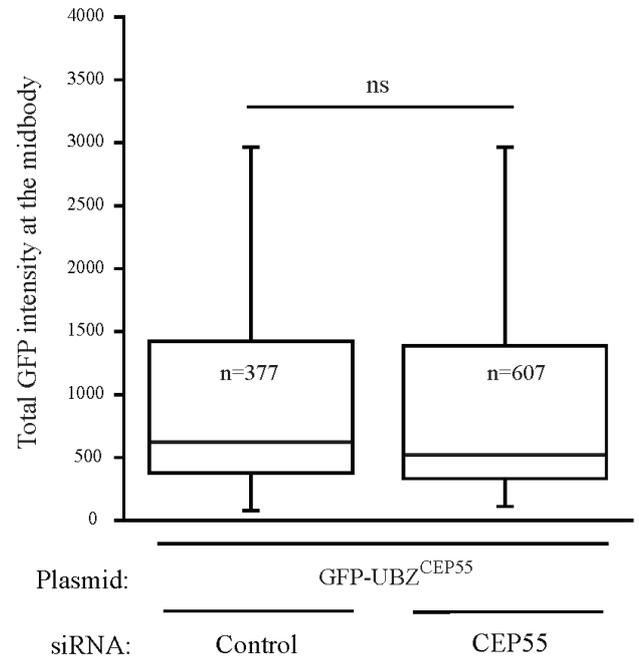
HeLa cells were concomitantly transfected with GFP-ZF and CEP55 siRNA before being analyzed by immunofluorescence and fluorescence microscopy. **A)** CEP55 and GFP-ZF expression levels were quantified by Western-Blot. **B)** Total GFP intensities at the midbody were quantified using MKLP-1 immunolabeling (dot) as midbody marker. The total numbers of midbodies (n) detected upon two independent experiments are indicated. ns: not significant ($p \geq 0.05$). **C)** Level of expression of CEP55 in parental and CRISPR-Cas9-mediated CEP55 knockout U2OS cell lines (gRNA CEP55^{-/-}) by Western-Blot. GAPDH was used as loading control.

FIGURE S10

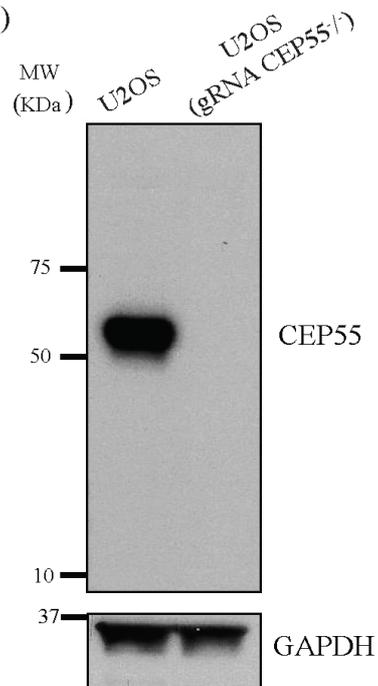
A)



B)



C)



III) COMMENTAIRE

A. **Caractérisation cellulaire et étude phénotypique de la lignée U20S K.O CEP55 générée par la technologie d'édition du génome CRISPR/Cas9**

Nos résultats ont nécessité la génération d'une nouvelle lignée U20S (human bone osteosarcoma epithelial cells) stablement invalidée pour le gène codant pour CEP55 (*CEP55* K.O). Pour ce faire, nous avons utilisé la technique d'édition du génome appelée CRISPR/CAS9. Cette lignée a été générée en collaboration avec L. Davignon et M. Charpentier au laboratoire et j'ai réalisé la caractérisation cellulaire et phénotypique de différents clones de cette lignée. À ma connaissance, il s'agit de la première description de cellules K.O de *CEP55* dans des lignées cellulaires humaines. Les cellules sont viables, ce qui pourrait suggérer que le gène *CEP55* n'est pas essentiel dans la lignée cellulaire U20S. Cependant, les cellules présentent des défauts de cytocinèse élevés en comparaison avec la lignée U20S sauvage. En effet, l'inactivation de CEP55 dans ces cellules conduit à une augmentation élevée du nombre de cellules présentant un pont intercellulaire (environ d'un facteur 3, Figure 56 A et B) ce qui reflète une cinétique de cytocinèse au moins 3 fois plus lente. Considérant que la durée moyenne de la cytocinèse est d'environ 3 heures dans les U20S, ces résultats suggèrent statistiquement que les cellules *CEP55* K.O requièrent environ 9 heures afin d'effectuer leur division cytoplasmique. De manière concomitante, les cellules présentent un nombre 4 fois plus élevé de cellules multi-nucléées comparées aux cellules sauvages (figure 56 A et C). Par ailleurs, une forte accumulation de corps intermédiaires résiduels (aussi appelés "midbody remnant") dans la lignée *CEP55* K.O a été observée (supérieur environ d'un facteur 4 comparée à la lignée WT, Figures 56 A et D). Ces résultats montrent ainsi le rôle déterminant de CEP55 dans les étapes tardives de la cytocinèse, mais également dans la dégradation des midbody remnant. Des études ont d'ailleurs révélé que ce processus de dégradation des midbody remnant est dépendant de l'autophagie.

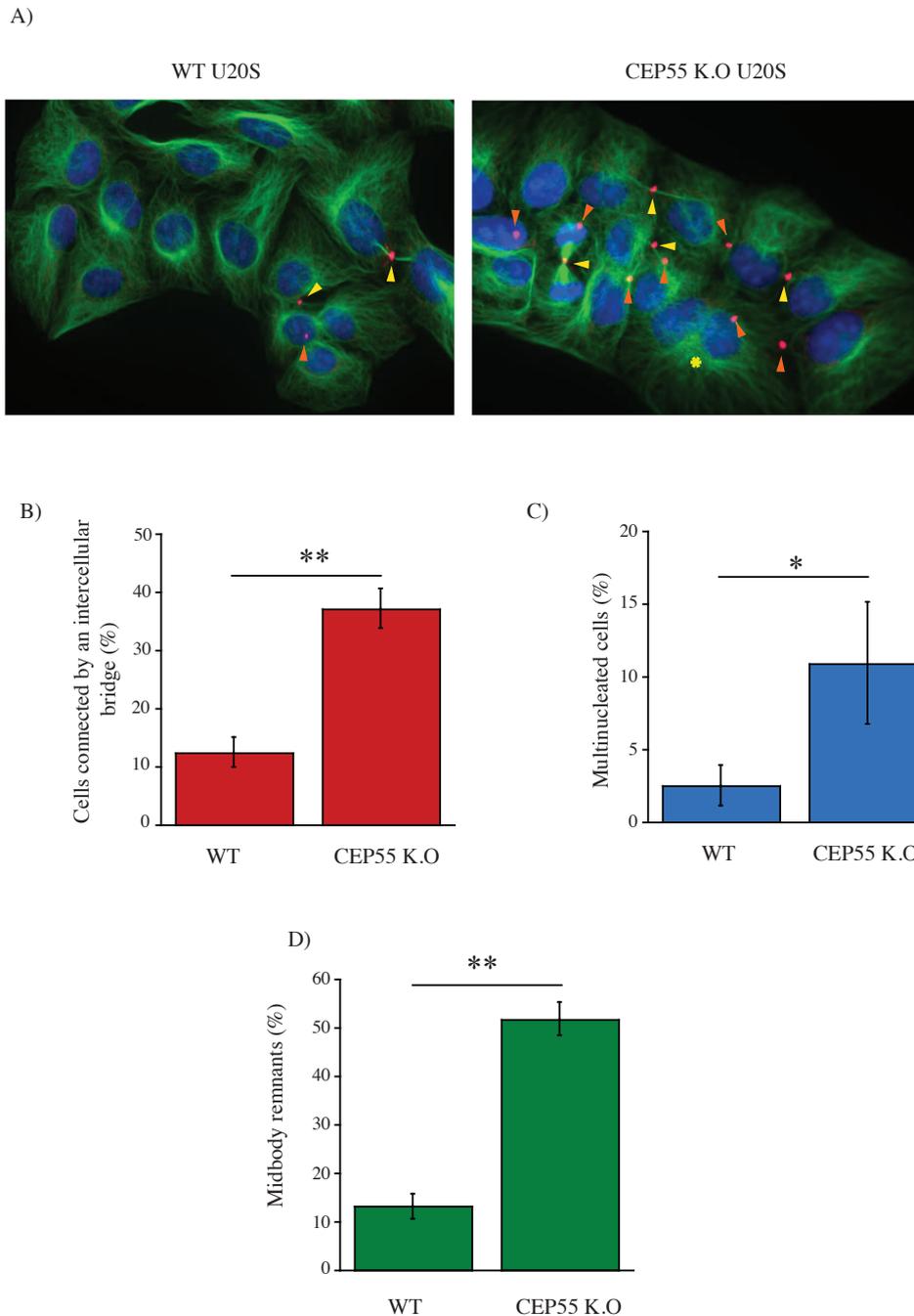


Figure 56 : L'invalidation du gène *CEP55* dans les cellules U20S conduit à des défauts de cytokinèse et de dégradation des midbody remnant

A) Immunofluorescence de cellules U20S K.O *CEP55* et WT. La tubuline est marquée en vert, les noyaux en bleu, les « midbody » au sein d'un pont intercellulaire et les midbody remnant sont marqués en rouge (MKLP-1). Les flèches jaunes correspondent aux « midbody » présents au sein d'un pont intercellulaire, les flèches orange aux midbody remnant » et les étoiles jaunes représentent les cellules multinucléées. B-C-D) Quantification des images représentées en (A) montrant les pourcentages de cellules connectées par un pont intercellulaire (B), de cellules multinucléées (C) et de « midbody remnant » (D) dans les cellules U20S WT et *CEP55* K.O. Les diagrammes sont issus de 5 expériences indépendantes et au moins 200 cellules ont été analysées par expérience.

Il est important de souligner que plusieurs tentatives expérimentales d'inactivation du gène *CEP55* par le système CRISPR/cas9 ont également été menées dans des cellules HeLa. Toutefois, contrairement aux cellules U2OS, aucun clone positif n'a pu être isolé en raison de leur faible viabilité. Ceci souligne assez bien que le caractère essentiel de *CEP55*, qui est indispensable au processus d'abscission via le recrutement de la machinerie ESCRT, peut être plus ou moins prononcé selon le type cellulaire. Il est possible que la simple résistance mécanique des ponts intercellulaires lors de l'abscission puisse être plus ou moins grande selon le type cellulaire, HeLa ou U2OS. Ceci pourrait conduire à une différence de viabilité entre les cellules HeLa et U2OS après inactivation complète du gène *CEP55*. Cela permettrait d'expliquer les raisons pour lesquelles il nous a été possible d'isoler des clones K.O de *CEP55* dans les cellules U2OS alors qu'aucun clone n'a pu être obtenu dans les cellules HeLa dans les mêmes conditions expérimentales. D'autres hypothèses pourraient être également formulées pour expliquer cette différence de résultats dans les lignées HeLa ou U2OS. En effet, une différence de compensation de signalisation impliquée dans la survie cellulaire dans les cellules HeLa ou U2OS pourrait aussi donner un début d'explication, mais ceci reste encore à être confirmé.

B. Rôle du ZF de CEP55 dans l'interaction avec les partenaires physiologiques de CEP55 au midbody

Les protéines sauvage de *CEP55* et le double mutant C440A/C443A comportant une double étiquette N-terminale His₆ et strep-tag-II (His-strep *CEP55* WT et His-strep *CEP55* C440A/C443A) ont été purifiées à partir de deux milliards de cellules embryonnaires de reins humains 293 « FreeStyle » (293-F). Les cellules 293-F (Invitrogen) sont dérivées de la lignée 293 qui ont été optimisées pour la culture cellulaire et pour être facilement transfectables dans des volumes de culture élevés. Les protéines sauvages et mutantes sont exprimées dans la fraction insoluble du lysat cellulaire. Nous avons donc purifié les protéines à partir des fractions insolubles en utilisant un protocole de dénaturation à l'urée suivie d'une renaturation de la protéine sur des billes de Ni-NTA durant la nuit. Les protéines immobilisées sur les billes ont été stockées dans un tampon contenant du glycérol à 50% à -20 °C afin d'éviter des cycles de congélation/décongélation qui pourraient favoriser l'agrégation des protéines. Ce protocole de purification a permis d'obtenir des degrés de pureté élevés des protéines His-

strep CEP55 WT et C440A/C443A comme le montre l'analyse par SDS-PAGE des billes Ni-NTA contenant les protéines sauvage et mutante (Figure 57A). Ces protéines ont tout d'abord été utilisées afin d'effectuer des expériences de « Ni-NTA Pull-down ». Brièvement, la protéine sauvage His-strep CEP55 WT et le double mutant C440A/C443A immobilisés sur les billes Ni-NTA ont été incubés avec des lysats cellulaires clarifiés issus de cellules HeLa S3 afin de détecter des interactions avec les partenaires physiologiques de CEP55, selon un protocole similaire à celui décrit dans l'article afin de détecter des interactions avec les partenaires physiologiques de CEP55 (Figure 57B). Des billes Ni-NTA seules ont été utilisées comme contrôle négatif afin d'évaluer la spécificité d'interaction des protéines cellulaires avec les protéines sauvage et mutante immobilisées sur les billes. La protéine GAPDH a été utilisée comme témoin interne afin d'évaluer les quantités protéiques d'extraits cellulaires qui ont été incubées avec chaque échantillon de billes (WT, C440A/C443A et seules). De façon intéressante, une interaction spécifique avec les partenaires MKLP1, ALIX et TSG101 a été observée en présence de la protéine CEP55 WT, indiquant que la protéine sauvage recombinante purifiée de CEP55 WT présente les mêmes propriétés d'interaction fonctionnelles que celles de la protéine native. Néanmoins, les interactions avec les protéines MKLP1, ALIX et TSG101 sont partiellement altérées avec le double mutant His-strep CEP55 C440A/C443A comparé à celles de la protéine CEP55 WT. Ces résultats révèlent que le domaine ZF jouerait également un rôle important dans l'assemblage protéique comportant les partenaires physiologiques MKLP1, ALIX et TSG101. Cependant, aucune forme ubiquitinée des différents partenaires n'a pu être détectée dans nos conditions expérimentales. Ceci suggère que l'interaction dépendante du ZF avec ces trois partenaires physiologiques, si elle est dépendante de l'ubiquitine, doit probablement s'effectuer de manière indirecte via une protéine cellulaire ubiquitinée qui reste encore à identifier.

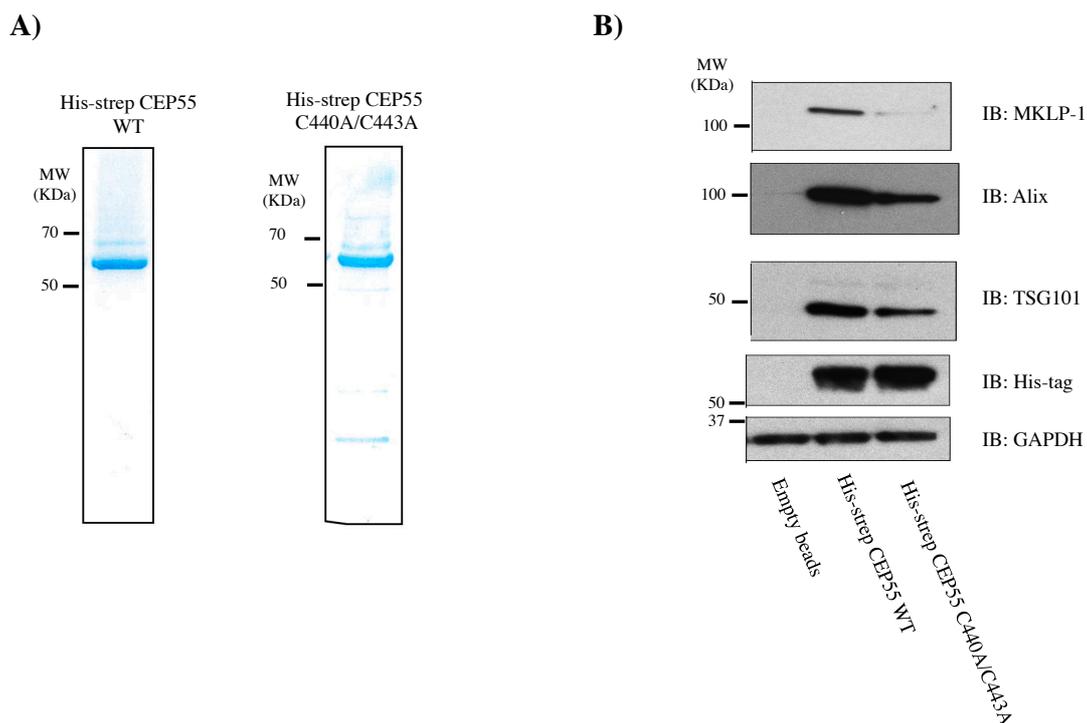


Figure 57 : Étude des propriétés d'interaction des protéines His-Strep CEP55 WT et C440A/C443A avec les partenaires connus de CEP55 au midbody

A) Analyse par SDS-PAGE des protéines His-strep CEP55 WT et C440A/C443A purifiées et immobilisées sur des billes Ni-NTA. **B)** Expérience de « Ni-Nta pull-down » des protéines His-strep CEP55 WT et C440A/C443A avec des extraits cellulaires d'HeLa S3. Les protéines MKLP1, ALIX et TSG101 ont été identifiées par Western Blot. Les quantités des protéines His-strep CEP55 WT et C440A/C443A au cours de l'expérience ont été contrôlées par un anticorps dirigé contre l'étiquette 6xHis. La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge des extraits bruts clarifiés qui ont été incubés avec chaque échantillon.

Dans ce chapitre, nous avons montré que les deux domaines UBDs NOA et ZF de CEP55 interagissent de façon autonome avec des chaînes de poly-ubiquitine et qu'ils exercent des rôles fonctionnels dépendants de l'ubiquitine différents au cours de la cytokinèse.

Dans le cas de la protéine NEMO, les domaines NOA et ZF sont séparés par une région flexible de 50 acides aminés non structurée et riche en proline (PRR). Il a pu être montré que ces deux domaines interagissent de façon coopérative avec de longues chaînes de poly-ubiquitine K63, constituant un domaine d'interaction à l'ubiquitine bipartite dénommé NOAZ (NOA-ZF). Dans le chapitre suivant nous avons ainsi cherché à étudier si les domaines NOA et ZF formant le domaine NOAZ de CEP55 peuvent interagir de façon

coopérative avec de longues chaînes d'ubiquitine. De plus, dans le cas de CEP55 cette région est sujette à différentes modifications post-traductionnelles et nous nous sommes demandé si ces modifications pouvaient réguler cette coopérativité.

Chapitre 2 : étude des propriétés d'interaction aux chaînes de poly-ubiquitine du domaine bipartite NOAZ de CEP55 et de leur régulation par des modifications post-traductionnelles et des changements conformationnels

Afin de caractériser biochimiquement le domaine NOAZ, contenant les deux UBDs NOA et UBZ, la protéine recombinante humaine His-NOAZ de CEP55 (résidus 296-464) a été purifiée à partir d'*E. Coli* dans les mêmes conditions que celles de la protéine His-NOA. L'analyse par SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie de la protéine recombinante montre un degré d'homogénéité supérieur à 95 % avec une masse moléculaire de 22 kDa compatible avec celle de la masse moléculaire théorique déduite de l'ADNc recombinant (figure 58A). On note toutefois la présence d'une bande polypeptidique mineure de masse équivalente à 45 kDa qui est reconnue par Western blot à l'aide d'anticorps anti-CEP55 (données non montrées). Ceci correspond à une fraction de dimère de CEP55 qui résulte de la dénaturation incomplète de la protéine malgré la dénaturation thermique (100 °C pendant 10 min), la présence de SDS et un excès de DTT dans le tampon d'analyse de l'échantillon. Cette dénaturation incomplète dans les conditions SDS-PAGE ainsi qu'une forme dimérique de l'échantillon protéique avaient fait l'objet d'une étude approfondie dans le cas d'étude de la protéine NEMO [555]. La présence résiduelle d'une forme dimérique de NEMO en conditions dénaturantes avait été observée lorsqu'une forte quantité de protéine est chargée et analysée dans le puits du gel d'électrophorèse (> 5 µg par puits) en utilisant des gels de polyacrylamide commerciaux prêts à l'emploi (Criterion XT Bis-Tris, Biorad), exempts de SDS.

L'état oligomérique de la protéine His-NOAZ a tout d'abord été étudié par chromatographie d'exclusion stérique puis par chromatographie d'exclusion stérique couplée en ligne à une analyse de diffusion de lumière statique aux multi-angles (SEC-MALS, Figure 58B haut). Les résultats de chromatographie d'exclusion stérique révèlent que la protéine His-NOAZ, dont la masse moléculaire théorique correspond à 22 500 Da, est éluée à un volume correspondant à celui d'une protéine globulaire de 68 000 Da (Figure 58B haut), suggérant que la protéine est majoritairement présente sous forme trimérique (masse théorique : 67,5 kDa). Toutefois, cette valeur a été obtenue à partir d'une courbe d'étalonnage basée sur les volumes d'élution de protéines globulaires de masses moléculaires connues. En effet, l'analyse de diffusion de la lumière statique aux multi-angles couplée à la réfractométrie ou l'absorbance en ligne pour suivre le profil d'élution de la protéine a révélé que la masse moléculaire expérimentale de His-NOAZ est de $45\ 000 \pm 1500$ Da, ce qui correspond idéalement non pas à une forme trimérique, mais dimérique de la protéine (Figure 58B bas).

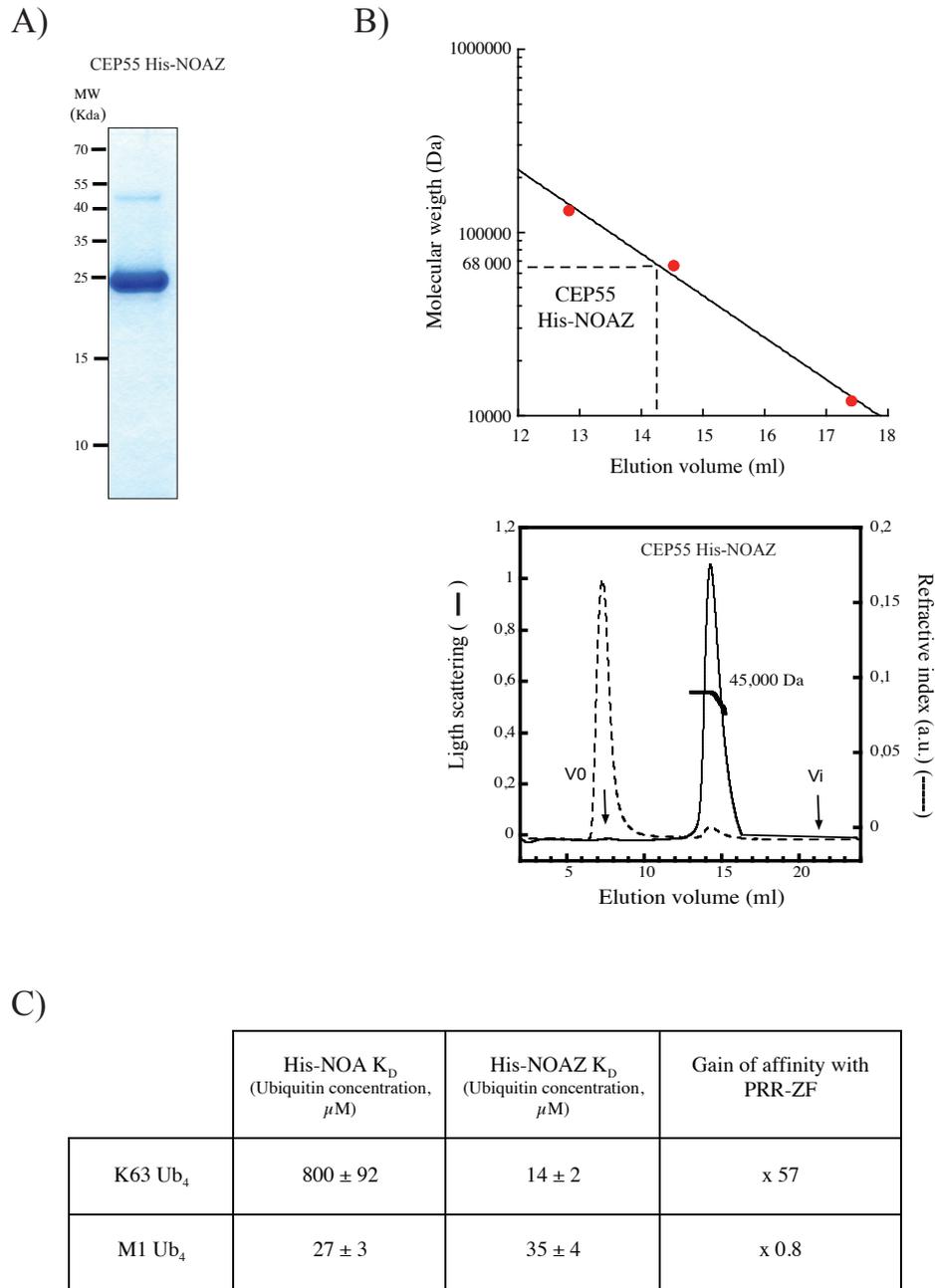


Figure 58 : Étude de l'état oligomérique du domaine His-NOAZ de CEP55 et de ses propriétés d'interaction aux tétra-ubiquitines K63 et M1

A) Analyse par SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie de la protéine His-NOAZ obtenue à l'issue de la chromatographie d'affinité Ni-NTA. **B)** Analyse de l'état oligomérique de CEP55 par chromatographie d'exclusion stérique couplée à une analyse de diffusion de lumière statique aux multi-angles (SEC-MALS). Haut : le volume d'éluion de la protéine His-NOAZ a été reporté sur une courbe d'étalonnage mesurée à partir de masses moléculaires connues de protéines globulaires (Dimère de BSA, 132 kDa; Monomère de BSA, 66 kDa ; cytochrome C, 12,4 kDa ; points rouges). Bas : Analyse par diffusion de la lumière statique aux multi-angles indiquant que la protéine His-NOAZ forme un dimère. **C)** Tableau récapitulatif des affinités obtenues par interférométrie sur bio-couche des protéines His-NOA et His-NOAZ de CEP55.

Par conséquent, ces résultats montrent clairement que la protéine His-NOAZ est présente majoritairement sous forme d'un dimère allongé. Par ailleurs, il est important de souligner que le domaine NOAZ de CEP55 forme un dimère beaucoup plus stable et homogène que celui du domaine NOA, où il avait été observé dans des conditions expérimentales similaires seulement 30 % de dimère (cf. Article, Chapitre 1).

Afin d'étudier les propriétés d'interaction aux chaînes de poly-ubiquitine K63 et M1, des expériences d'interférométrie sur bio-couche ont été réalisées en présence de chaînes de tétra-ubiquitine M1 et K63 purifiées et synthétisées au laboratoire par E. Fontan. Les affinités sont indiquées dans le tableau par les valeurs de constante de dissociation (K_D). Ces dernières ont été déterminées pour chaque domaine NOA et NOAZ et chaque type de chaîne de tétra-ubiquitine M1 ou K63 (Figure 58C). Le domaine bipartite His-NOAZ ne discrimine pas les chaînes M1 des chaînes K63, puisque des affinités similaires pour ces deux types de chaînes ont été obtenues. Par ailleurs, elles sont du même ordre que celle déterminée entre le domaine His-NOA et les chaînes de tétra-ubiquitine linéaire Ub₄ M1. De façon intéressante, le domaine bipartite NOAZ de CEP55 présente en revanche un gain d'affinité 57 fois plus élevé pour les chaînes de tétra-ubiquitine Ub₄ K63 que le domaine NOA seul. Par conséquent, la contribution du deuxième domaine d'interaction à l'ubiquitine de CEP55, l'UBZ, semble induire un gain d'affinité exclusivement avec les chaînes de tétra-ubiquitine K63, et pas les chaînes linéaires Ub₄ M1. Ceci est intéressant et à la fois surprenant car ces deux types de tétra-ubiquitine M1 et K63 sont structurellement similaires. Un mécanisme d'avidité similaire avait été préalablement observé entre les domaines NOA et UBZ du domaine NOAZ de NEMO [136]. Toutefois, le domaine NOAZ de CEP55 reconnaît avec des affinités similaires les chaînes de tétra-ubiquitines Ub₄ M1 et K63 alors qu'il avait été montré que celui de NEMO présente une certaine sélectivité de reconnaissance pour les longues chaînes de poly-ubiquitine K63 par rapport aux chaînes de poly-ubiquitine M1 de longueur équivalente [147].

De façon intéressante, la région charnière de CEP55 (405-434) reliant les deux domaines UBDs NOA et UBZ et contenant un nombre important de résidus Pro (PRR) a été décrite comme étant sujette à différentes modifications post-traductionnelles. Une analyse plus approfondie de cette séquence au laboratoire a permis de prédire que cette région est flexible et ne forme pas de structures secondaires périodiques (α -hélice ou brins β). Les sérines S425 et S428 contenues dans cette région ont été montrées comme étant

phosphorylées *in cellula* par les kinases CDK1 et ERK2 au cours de la mitose [481]. De plus, ces résidus présentent en position $i+1$ un résidu proline (P426 et P429). Il a été proposé que les phosphorylations des sérines 425 et 428 soient pré-requises pour induire la trans-isomérisation de la région PRR de CEP55 par la prolyl cis-trans isomérase PIN1 [488, 489]. Cette enzyme reconnaît spécifiquement les substrats présentant une sérine ou une thréonine phosphorylée à $i-1$ par rapport aux résidus prolines [556]. Contrairement aux liaisons amides des peptides qui sont majoritairement sous la forme *trans* (Figure 59A), celles précédant les prolines au sein des protéines adoptent généralement des conformations *cis* et *trans* (figure 59B). La conversion d'une forme vers l'autre est lente et peut être catalysée par des prolyl cis-trans isomérases. De façon intéressante, la prolyl cis-trans isomérase PIN1 permet de catalyser spécifiquement l'isomérisation de la liaison peptidique entre une sérine et/ou une thréonine phosphorylée et une proline, pouvant ainsi moduler la structure tridimensionnelle des protéines et leur fonction [556].

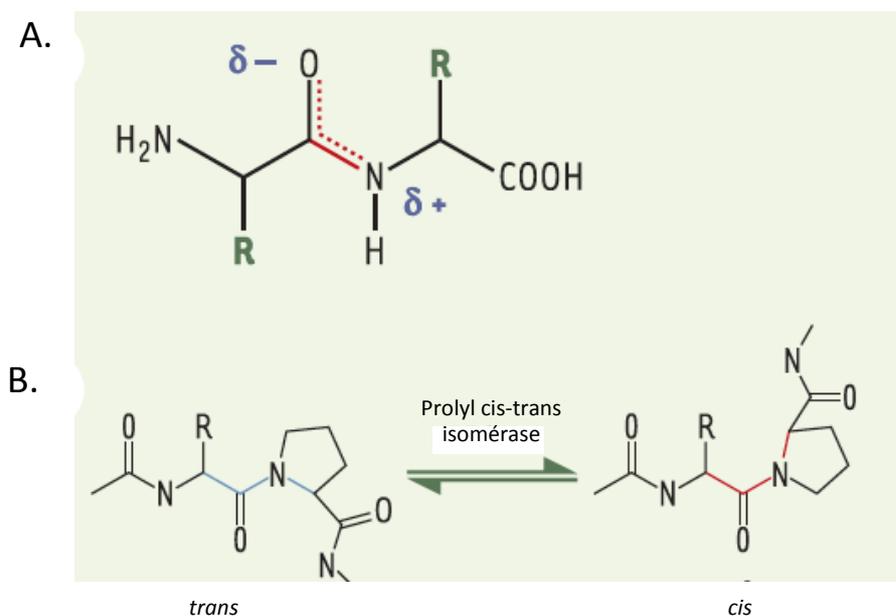


Figure 59 : Réaction de cis-trans isomérisation des liaisons peptidiques faisant intervenir une proline catalysée par des prolyl cis-trans isomérases

Extrait de [557] **A.** Les liaisons peptidiques sont quasi exclusivement dans la conformation *trans* notamment pour des raisons d'encombrement stérique de leurs chaînes latérales. Le caractère de double liaison partielle de la liaison peptidique défavorise la transition d'une forme *trans* à une forme *cis*. **B.** Dans le cas des prolines, les formes *cis* et *trans* coexistent dans les protéines mais la réaction d'isomérisation d'une conformation vers l'autre est lente et peut être catalysée par des prolyl cis-trans isomérases.

Nous avons ainsi cherché à étudier par la suite si la phosphorylation et/ou cis-trans isomérisation des résidus proline de la région charnière PRR reliant les domaines NOA et ZF pouvaient moduler les propriétés d'interaction du domaine NOAZ aux chaînes de poly-ubiquitine *in vitro*.

Pour ce faire, nous avons construit et purifié la protéine GST-NOAZ afin d'accroître la stabilité de la forme dimérique mais surtout pour augmenter la solubilité de la protéine chez *E. coli* sans avoir recours à une étape de dénaturation à l'urée comme avec la version His₆-NOAZ. Malgré la présence de la GST ou l'induction de la protéine à basse température, la protéine GST-NOAZ était insoluble chez *E. coli*. Nous avons donc dû mettre au point un nouveau protocole de dénaturation/renaturation partielle de la protéine GST-NOAZ recombinante qui est exprimée principalement sous forme de corps d'inclusion. Ce dernier repose sur l'utilisation d'une concentration optimale du détergent sarkosyl afin de renaturer correctement la GST qui est requise pour l'étape de chromatographie d'affinité à l'aide de son substrat le glutathion (GSH). (cf. Matériels et Méthode). L'analyse par SDS-PAGE (figure 60A) de la protéine montre que la protéine GST-NOAZ est majoritaire malgré la présence en faible quantité de bandes polypeptidiques correspondant à des formes protéolysées en C-terminales de la protéine GST-NOAZ (vérifié par Western-Blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre la GST, données non montrées).

Dans un premier temps, nous avons cherché à phosphoryler *in vitro* la protéine GST-NOAZ par la kinase ERK2. Pour cela, la protéine GST-NOAZ a été incubée en présence d'ATP et de la protéine recombinante GST-ERK2 puis analysée par SDS-PAGE suivi d'une coloration au bleu de Coomassie (figure 60B). De façon intéressante, la bande polypeptidique correspondant à la protéine GST-NOAZ présente une migration sur gel légèrement retardée comparée à celle de l'échantillon contrôle non incubé avec la kinase ERK2 ou l'ATP. De plus, ce retard de migration sur gel disparaît lorsque de la λ -phosphatase est ajoutée dans le milieu réactionnel (figure 60B). Ces résultats montrent que la protéine GST-NOAZ est phosphorylée *in vitro* par la kinase ERK2 dans ces conditions expérimentales. Afin de déterminer le/les résidu(s) phosphorylé(s) dans nos conditions expérimentales, les expériences de phosphorylation ont été reproduites et la bande polypeptidique phosphorylée/retardée a été analysée par spectrométrie de masse en collaboration avec l'unité de Spectrométrie de Masse Structurale et Protéomique de l'Institut Pasteur dirigée par Julia Chamot-Rooke. Brièvement, la bande polypeptidique correspondant à la protéine GST-NOAZ phosphorylée a été découpée du gel humide puis digérée par la trypsine avant d'être analysée par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Comme montré dans la figure 60 C, la fragmentation du seul

peptide trypsique dont la masse moléculaire avait été modifiée par rapport à celle théorique a permis de révéler que seule la sérine 428 est phosphorylée au sein de la protéine GST-NOAZ, et cela sur la base d'un taux de recouvrement peptidique de la protéine de 71%.

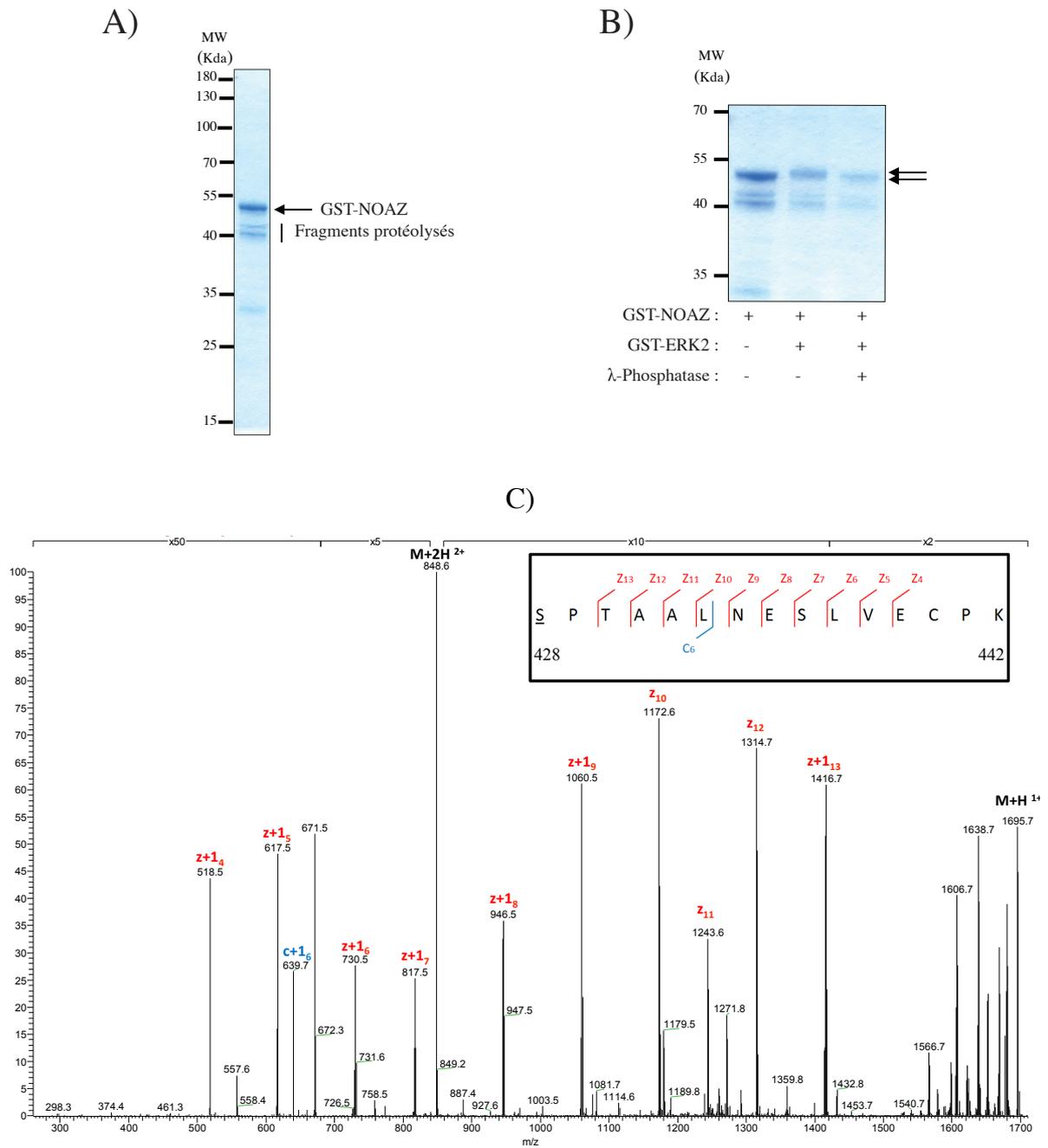


Figure 60 : Analyse des évènements de phosphorylation *in vitro* de la protéine GST-NOAZ de CEP55 par ERK2

A) Analyse par SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu de Coomassie de la protéine GST-NOAZ à l'issue de la chromatographie d'affinité GSH. **B)** Étude des évènements de phosphorylation de la GST-NOAZ par ERK2 par retard sur gel. Les flèches représentent les formes non-phosphorylées et phosphorylées de GST-NOAZ. **C)** Spectrogramme de masse après fragmentation du peptide tryptique SPTAALNESLVECPK comportant une masse moléculaire modifiée de + 98 Da par rapport à celle théorique. Le résidu phosphorylé identifié après fragmentation est souligné (S428).

Afin de déterminer l'effet de la phosphorylation S428 par ERK2 ainsi que l'effet de la prolyl-cis trans isomérisation médiée par PIN1 sur les propriétés d'interaction du domaine NOAZ à l'ubiquitine, la protéine GST-NOAZ a d'abord été incubée en présence ou en absence de ces deux enzymes. Des expériences de « GST-pull down » en présence de chaînes de poly-ubiquitine K63 purifiées de différentes longueurs ont ensuite été réalisées. Comme montré dans la figure 61, la présence de la protéine GST-ERK2 conduit, comme décrit précédemment, à un retard de migration sur gel de la protéine GST-NOAZ en présence d'ATP. Néanmoins, la phosphorylation ne modifie ni ses propriétés d'interaction aux chaînes de tri-ubiquitine K63 Ub₃, ni celles des tétra-ubiquitines K63 Ub₄. En revanche, l'addition de la protéine PIN1 dans le milieu réactionnel conduit à une augmentation importante de l'interaction du domaine NOAZ pour les chaînes de poly-ubiquitine K63 Ub₄ et Ub₅ (figure 61). De façon intéressante, cet effet n'est pas observé avec des chaînes K63 plus courtes telles que les tri-ubiquitines K63 Ub₃, indiquant que ce gain d'affinité ne peut être observé qu'avec une longueur optimale de chaînes de poly-ubiquitine, comportant au moins quatre molécules d'ubiquitine. En outre, un contrôle supplémentaire en présence de PIN1 mais en absence d'ATP a été réalisé avec des penta-ubiquitines K63. Il a permis de révéler que ce gain d'activité de liaison aux chaînes K63 est bien dépendant de la phosphorylation de la protéine GST-NOAZ et non de la présence de PIN1 dans le milieu réactionnel. A titre de contrôle, des expériences similaires en présence de la kinase ERK2 et de PIN1 ont été réalisées avec des tétra-ubiquitines linéaires Ub₄ M1. Elles n'ont révélé aucune modification des propriétés d'interaction du domaine NOAZ de CEP55 avec ce type de chaînes de poly-ubiquitine (non montré).

Par conséquent, l'ensemble de ces résultats a permis de montrer pour la première fois que la phosphorylation du domaine charnière du domaine NOAZ par la kinase ERK2, suivie d'une incubation avec l'isomérase PIN1, conduit à un gain de spécificité d'interaction avec chaînes de poly-ubiquitine K63 comparé aux chaînes de poly-ubiquitines linéaires M1.

CONCLUSION/DISCUSSION

Dans cette partie, je reviens et discute point par point des résultats obtenus pendant ma thèse. Premièrement, les aspects structuraux et les résultats obtenus *in vitro* des domaines NOA, ZF et NOAZ sont abordés. Dans une seconde partie, je discute des rôles fonctionnels de ces domaines dans la cytokinèse et la dégradation des midbody remnant. Par ailleurs, les résultats d'une campagne de criblage visant à identifier des ubiquitine ligases et déubiquitinasés impliqués dans l'abscission, sont discutés. Enfin, l'identification de nouveaux "UBDs" chez CEP55 soulève de nouvelles questions telles que leur implication dans d'autres fonctions connues de CEP55 et dans les pathologies associées à cette protéine.

I) Les propriétés d'interaction à l'ubiquitine des domaines NOA, UBZ et NOAZ de CEP55

A. Les résidus 435-464 de CEP55 forment un domaine UBZ dont le mode d'interaction à l'ubiquitine est le plus conservé avec celui de la sous-famille UBZ WRNIP1/RAD18

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que les résidus 435-464 de CEP55 forment un domaine autonome capable de se structurer selon une architecture en doigt de zinc (zinc finger). Par ailleurs, nous avons montré que ce domaine interagit de façon spécifique avec l'ubiquitine *in vitro* faisant de ce domaine un nouveau domaine d'interaction à l'ubiquitine (UBD) de type ZF.

Les expériences de polarisation de fluorescence à l'aide de peptides synthétiques couplés à la fluorescéine (F-ZF) ont montré des affinités similaires du ZF de CEP55 pour de la mono-ubiquitine et les di-ubiquitines K63 ($123 \pm 47 \mu\text{M}$; $127 \pm 38 \mu\text{M}$ respectivement). Ainsi, nos résultats suggèrent que contrairement au domaine ZF de NEMO [146], le domaine ZF de CEP55 ne présente pas de deuxième site d'interaction à l'ubiquitine pouvant lui conférer une préférence pour les di-ubiquitines comparé à de la mono-ubiquitine.

De façon surprenante, les expériences d'interférométrie sur bio-couche (BLI) ont montré des affinités du domaine ZF de CEP55 bien supérieures pour de la GST-Ub2 M1 et pour un mélange de chaînes d'ubiquitine K63 biotinylées comparées à celles issues des expériences de polarisation de fluorescence. Les différences d'affinités observées peuvent être

dues aux conditions expérimentales qui ne sont pas les mêmes dans les deux techniques. Premièrement, les expériences de polarisation de fluorescence ont été réalisées en présence de détergent afin de minimiser les interactions non spécifiques de la fluorescéine avec l'ubiquitine. De plus, dans les expériences de BLI, les ubiquitines sont immobilisées sur le bio-senseur ce qui pourrait par réduction de l'entropie d'interaction favoriser l'interaction entre le ZF et les poly-ubiquitines.

Par ailleurs, en utilisant la même technique, - interférométrie sur bio-couche -, une affinité plus faible a été obtenue pour le mélange de chaînes d'ubiquitine K48 comparé à celle obtenue pour les K63, suggérant une préférence du domaine ZF pour des chaînes K63. La raison structurale de cette préférence pourrait être due aux propriétés des chaînes K63 qui confèrent une plus forte accessibilité de leurs patches hydrophobes centrés autour de l'Ile44 comparé aux chaînes K48. Une analyse plus fine de cette sélectivité des chaînes K63 comparé aux chaînes K48 pourra être entreprise pour une longueur de chaîne bien définie (Ub2, Ub3, Ub4 etc.) par cette même technique.

Bien que nous n'ayons pas résolu la structure tridimensionnelle du domaine ZF de CEP55 permettant de déterminer de façon non ambiguë sa classe d'UBD de type ZF, il est hautement probable qu'il appartienne à la classe des UBZ. En effet, sur la base d'alignements de séquence avec différents UBZ, nous avons mis en évidence que le ZF de CEP55 présente un motif de tétra-coordination du zinc de type CCHC. Or, parmi les ZFs de type UBD, ce motif de tétra-coordination n'est uniquement retrouvé qu'au sein de la famille des UBZs, hormis les ZF-UBPs qui sont constitués de plus de 100 résidus (cf. introduction).

L'analyse des alignements de séquence couplée à l'étude des structures de complexe connues UBZ:ubiquitine suggère très fortement que le ZF de CEP55 adopte un mode d'interaction à l'ubiquitine similaire à celui appartenant à la sous-famille WRNIP1/RAD18 des UBZs. Premièrement, le motif signature "DX₃L/CX₂L" contenu dans l'hélice α des UBZs et caractéristique des deux autres sous groupe d'UBZs, Pol η /FAAP20 et NDP52, n'est pas conservé chez CEP55. Deuxièmement, le domaine ZF de NEMO ne présente pas de résidu acide conservé porté par l'hélice α à la différence de WRNIP1, RAD18 et CEP55 et nous avons montré que ce résidu au sein du ZF de CEP55 (E460) est critique dans l'interaction avec l'ubiquitine par deux techniques indépendantes. Enfin, quatre autres résidus impliqués dans l'interaction de WRNIP1/RAD18 avec l'ubiquitine sont conservés chez CEP55 (V438, P441, L455 et V459).

La modélisation du domaine ZF de CEP55 en interaction avec l'ubiquitine a donc été entreprise à partir du complexe cristallin entre la GFP-ZF de WRNIP1 et la mono-ubiquitine, et un affinement de l'interface par recuit simulé a été entrepris. Le modèle structural révèle que certains résidus qui ne sont strictement conservés entre les UBZs de CEP55 et WRNIP1/RAD18 peuvent être néanmoins fonctionnellement équivalents. Ainsi, les résidus K422, L456 et S463 de CEP55 sont respectivement remplacés par les résidus V22, N33 et L40 chez WRNIP1 et RAD18 (numérotation WRNIP1). La substitution d'un résidu hydrophobe valine par un résidu chargé lysine est de prime abord prédite comme étant énergétiquement défavorable chez CEP55. Cependant, ce n'est pas le groupement ϵNH_2 de la lysine exposé au solvant qui interagit avec l'ubiquitine mais sa longue chaîne aliphatique. Cette dernière interagit en effet avec le "patch" canonique hydrophobe de l'ubiquitine centré autour de l'Ile 44 via des interactions hydrophobes. De plus, la partie de la chaîne latérale aliphatique de l'asparagine (β -methyl) chez WRNIP1/RAD18 stabilise le patch hydrophobe de l'ubiquitine [188] et cette interaction est bien conservée puisque le résidu N33 est remplacé par une leucine (L456) chez CEP55. Enfin, l'interaction hydrophobe médiée par la leucine 40 de WRNIP1/RAD18 avec l'ubiquitine peut être fonctionnellement remplacée par le groupement CH_2 en position β de la sérine 463. Il est important de noter que selon notre modèle structural de nouveaux contacts entre l'ubiquitine et l'UBZ de CEP55 peuvent être établis entre le résidu E440 de CEP55 et l'His 68 et la Lys 6 de l'ubiquitine. Ces interactions ne sont pas présentes dans les complexes des UBZs WRNIP1/RAD18.

Ainsi, le domaine UBZ de CEP55 est très proche de la famille WRNIP1/RAD18 et d'éventuelles différences entre ces UBZs pourront être confirmées par mutagénèse dirigée, mais surtout en déterminant la structure de l'UBZ de CEP55 en interaction avec l'ubiquitine. Un projet de résolution structurale du domaine UBZ par RMN avait d'ailleurs été initié. Nous avons purifié à homogénéité le domaine UBZ de CEP55 fusionné à la GST présentant une séquence de protéolyse spécifique à la thrombine entre les deux domaines (GST-UBZ). La protéine GST-UBZ est soluble mais après hydrolyse à la thrombine afin d'isoler le domaine UBZ, nous avons observé que ce domaine isolé précipitait à forte concentration, ce qui nous avait amené à arrêter le projet. Toutefois, il pourrait être intéressant d'utiliser l'instrument de mesure de diffusion dynamique de la lumière au laboratoire (DynaPro Plate reader II, Wyatt technology) pour tenter de trouver des conditions optimales de solubilité (tampon, détergent, pH, force saline, température) afin de relancer le projet de résolution structurale du domaine UBZ en interaction avec l'ubiquitine par RMN.

B. Les résidus 304-396 forment un domaine NOA proche de ABIN2

Nous avons mis en évidence que les résidus (304-396) de CEP55, en accord avec les prédictions de « coiled-coil » du logiciel « Paicoil2 », présentent une forte hélicité ainsi qu'une capacité à dimériser en solution. De plus, nous avons montré que ces résidus présentent une sélectivité d'interaction pour les chaînes de tétra-ubiquitine M1 comparées aux chaînes K63, K48 et K11. Ces propriétés sont réminiscentes de celles des domaines NOA de NEMO, OPTINEURIN et ABIN-2 et définissent ainsi le fragment de CEP55 contenant les résidus 304-396 comme un nouveau membre de la famille NOA (aussi appelé, UBAN, NUB, CoZi ou CC2-LZ).

Bien que le dimère isolé du domaine NOA soit moins stable en solution comparé à celui de NEMO, il est fort probable que sa stabilité soit augmentée dans le contexte de la protéine CEP55 entière. Premièrement, nous avons montré que le domaine His-NOAZ (296-464) de CEP55 forme un dimère plus stable en solution. Cette protéine présente à la fois une heptade supplémentaire en N-terminal de 8 résidus, mais également une longue extension C-terminale de 68 résidus (PRR-ZF) pouvant ainsi stabiliser la structure du « coiled-coil » dimérique aux extrémités N- et C-terminales. En outre, les domaines CC1, EABR et CC2 au sein de la protéine entière doivent aussi probablement contribuer à stabiliser la forme dimérique du domaine NOA de CEP55 (figure 1A de l'article).

Les expériences de « pull-down » et d'interférométrie sur bio-couche (BLI) visant à déterminer les interactions de ce domaine vis-à-vis des différentes chaînes d'ubiquitine ont été réalisées à partir de la protéine His-NOA immobilisée en N-terminal soit sur des billes Ni-NTA soit à l'aide d'anticorps anti-penta His préalablement immobilisés. Cette immobilisation en N-terminale pourrait artificiellement stabiliser la forme dimérique du domaine, en diminuant l'entropie de dimérisation. En accord avec cela, une interaction spécifique du domaine His-NOA a été observée pour les différentes chaînes d'ubiquitine. Il est toutefois possible que dans nos conditions expérimentales, seule une fraction du domaine His-NOA soit sous une forme dimérique et que les affinités mesurées soient ainsi sous-estimées.

Par ailleurs, nous ne pouvons exclure l'hypothèse selon laquelle les chaînes d'ubiquitine linéaire stabilisent préférentiellement la forme dimérique du domaine NOA de CEP55, pouvant ainsi biaiser les résultats obtenus sur la sélectivité de ce domaine pour les

chaines M1 comparée aux chaînes K63. En effet, pour le domaine NOA de NEMO, les interactions entre les chaînes M1 et le domaine NOA font intervenir les deux monomères au sein du « coiled-coil » dimérique, alors que ce n'est pas le cas avec les chaînes K63. Or, même si le domaine NOA établit des contacts avec les chaînes K63 via un seul monomère, il est hautement probable que le monomère doive être structuré en hélice α , et donc dans sa forme dimérique pour permettre un agencement tridimensionnel optimal des déterminants impliqués dans l'interaction avec l'ubiquitine distale des chaînes K63. (N. B. : les monomères de structure « coiled-coil » n'ont jamais de structure périodique, c'est toujours leur dimérisation qui induit leur structuration en hélice α). Même si cette hypothèse est vraie, cela signifie que le domaine NOA de CEP55 présente bien un deuxième site d'interaction spécifique aux ubiquitines linéaires lui conférant théoriquement une préférence d'interaction à ce type de chaînes d'ubiquitine comparé aux K63. C'est cette sélectivité (x 30) du domaine NOA isolé pour les chaînes M1 par rapport aux chaînes K63 qui pourrait être surestimée dans nos conditions expérimentales.

La résolution structurale des domaines NOA de NEMO, OPTINEURIN et ABIN2 ont permis de mettre en évidence de légères différences du mode d'interaction avec les chaînes d'ubiquitine linéaire entre les domaines NOA de NEMO et OPTINEURIN et ABIN2. De façon intéressante, des résidus importants dans l'interaction avec l'ubiquitine distale sont uniquement présents chez ABIN2 comme les résidus R295, Q301 et D316. Ces trois résidus sont strictement conservés chez CEP55. De plus, les résidus qui ont été rapportés dans la littérature comme responsables de la spécificité d'interaction du domaine NOA de NEMO vis-à-vis des ubiquitines linéaires (principalement les résidus impliqués dans les interactions avec l'ubiquitine proximale) sont parfaitement conservés avec OPTINEURIN, tandis qu'ils ne sont que partiellement conservés chez ABIN2 et CEP55. Par exemple, alors que les résidus R316, R319 et E320 de NEMO sont parfaitement conservés chez ABIN2, les résidus E324 et E327 ne le sont pas. Pour CEP55, le résidu R319 est strictement conservé mais les résidus R316, E320 de NEMO sont remplacés par les résidus K367 et Q371 chez CEP55, respectivement. Ces substitutions sont prédites comme étant énergétiquement et spatialement défavorables à l'interaction avec l'ubiquitine proximale, même si les mêmes types d'interaction avec l'ubiquitine (pont salin et liaison hydrogène) peuvent être maintenus. De plus, comme pour ABIN2 les résidus E324 et E327 de NEMO ne sont pas conservés chez CEP55. En revanche, le résidu Q321 de ABIN2 qui n'est pas conservé chez NEMO et

OPTINEURIN renforce l'interaction avec l'ubiquitine proximale et est parfaitement conservé chez CEP55.

Ainsi, l'analyse des alignements de séquence guidée par les différentes structures des complexes NOA en interaction avec une di-ubiquitine linéaire ou K63 montre que le domaine NOA de CEP55 présente plus d'homologie avec celui de ABIN2 qu'avec ceux de NEMO et OPTINEURIN. De plus, elles permettent de comprendre les raisons de la spécificité du domaine NOA de CEP55 pour des chaînes d'ubiquitine linéaires comparées aux chaînes K63, K48 et K11. Comme pour le domaine UBZ, la résolution du complexe entre le domaine NOA de CEP55 et des chaînes d'ubiquitine linéaire permettra de confirmer un mode d'interaction globalement similaire à celui de ABIN-2 et de révéler d'éventuelles spécificités du domaine NOA de CEP55 au sein de la famille NOA.

C. La coopérativité des domaines NOA et UBZ au sein de NOAZ et sa régulation

Les résultats obtenus ont révélé un gain d'affinité élevé du domaine bipartite His-NOAZ (NOA + UBZ) pour les chaînes de tétra-ubiquitine K63 par rapport au domaine His-NOA seul. De plus, aucun gain d'interaction pour les ubiquitines linéaires n'a été observé entre les domaines NOA et NOAZ montrant que seul le domaine NOA au sein du NOAZ contribue à l'interaction avec les chaînes d'ubiquitine linéaires.

Comme discuté dans la partie précédente, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle cette différence d'affinité pour les chaînes K63 soit artificiellement accrue par la différence de l'état oligomérique observée entre le domaine His-NOAZ (dimère stable) et His-NOA (dimère moins stable). L'hypothèse qui a été formulée est que les chaînes linéaires pourraient fortement stabiliser l'état dimérique du domaine NOA ce qui expliquerait pourquoi le domaine NOA et le domaine bipartite NOAZ présenteraient la même affinité pour les chaînes M1. Sachant que le domaine NOA doit être dimérique pour interagir efficacement avec les chaînes K63 (qui présenteraient moins cette capacité de stabilisation du dimère que les chaînes linéaires), cette différence d'affinité obtenue entre His-NOA et His-NOAZ pour les chaînes K63 pourrait peut-être refléter un défaut de dimérisation du domaine His-NOA isolé en présence des chaînes d'ubiquitine K63.

Cependant, un gain d'interaction spécifique du domaine NOAZ de NEMO a été observé pour de longues chaînes d'ubiquitine K63 comparé au domaine NOA isolé, qui lui, forme un dimère stable en solution. Ainsi, le fait d'observer le même effet chez CEP55 traduit probablement une réelle coopérativité des deux domaines NOA et UBZ au sein de NOAZ pour les chaînes d'ubiquitine K63 et non pour les chaînes M1 (Figure 62). Cette coopérativité serait permise pour de longues chaînes d'ubiquitine K63 mais pas pour des chaînes M1 à cause probablement des agencements spatiaux différents des liens de polymérisation entre ces deux types de chaînes. La liaison amide reliant physiquement chaque molécule d'ubiquitine au sein de chaînes d'ubiquitine linéaire ne permet qu'un ensemble de conformations restreint en solution. En revanche, la liaison isopeptidique pour les chaînes K63 permet un ensemble conformationnel bien plus grand. Parmi les conformations spécifiques des chaînes K63 comparées aux M1, une ou plusieurs conformations pourraient être sélectionnées par une interaction avide entre les domaines NOA et UBZ de CEP55. De plus, pour les tétra-ubiquitines linéaires, l'interaction d'une deuxième molécule d'ubiquitine sur le deuxième site du NOA restreint également probablement cet ensemble conformationnel empêchant une interaction avide entre les domaines NOA et UBZ (figure 62).

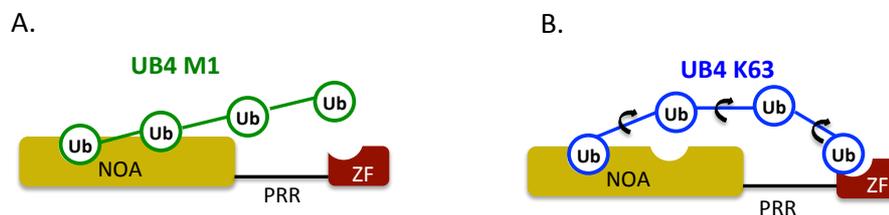


Figure 62 : Modèle des modes d'interaction du domaine NOAZ avec des tétra-ubiquitines M1 et K63

A. Au sein du domaine NOAZ, seul le domaine NOA reconnaît les tétra-ubiquitines M1 en interagissant avec les deux ubiquitines les plus distales de la chaîne. B. La propriété de libre rotation des liaisons isopeptidiques reliant les différentes unités d'ubiquitine via le groupement ϵ NH2 de la lysine 63 (ubiquitine proximale) et le groupement carboxylique C-terminal de l'ubiquitine adjacente (ubiquitine distale) permet une interaction avide par les deux UBDs de CEP55 pour les chaînes K63. L'ubiquitine distale au sein de la tétra-ubiquitine K63 est reconnue par le premier site du domaine NOA et l'ubiquitine proximale est reconnue par l'UBZ de CEP55.

Afin de confirmer que l'interaction du domaine NOAZ avec les chaînes K63 est bien due à une interaction coopérative entre les deux UBDs de CEP55, il pourra être envisagé de purifier la protéine His-NOAZ présentant la mutation E460A dans le domaine UBZ. Ce mutant ne sera très probablement pas altéré dans sa capacité à dimériser. Nous pourrons ainsi

vérifier par comparaison avec la protéine sauvage His-NOAZ la contribution spécifique du site d'interaction à l'ubiquitine porté par l'UBZ de CEP55 sur son interaction avec de longues chaînes d'ubiquitine K63.

Par ailleurs, nous avons montré que la phosphorylation *in vitro* de la sérine 428 de NOAZ par ERK2 suivie d'un traitement par la prolyl-cis-trans isomérase PIN1 conduit à un gain d'interaction du domaine NOAZ pour de longues chaînes d'ubiquitine K63 (Ub₄, Ub₅ mais pas Ub₃) mais pas pour de longues chaînes d'ubiquitine M1. Ces résultats vont également dans le sens d'une interaction avide des deux UBDs NOA et ZF au sein de NOAZ pour des longues chaînes d'ubiquitine K63. Comme nous l'avons vu, c'est l'ajout de PIN1 dans le milieu réactionnel, en présence de la kinase ERK2, qui conduit à ce gain d'affinité pour les chaînes K63. Un contrôle supplémentaire tel que l'utilisation de l'inhibiteur juglone de PIN1, ou d'un mutant catalytique de PIN1 pourra être réalisé afin de valider que c'est bien l'activité catalytique de cis-trans isomérisation de PIN1 qui est importante pour ce gain d'affinité. Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus suggèrent fortement une régulation de l'activité de liaison aux chaînes d'ubiquitine K63 par trans-isomérisation de la région PRR par PIN1. Ces événements de phosphorylation et de cis-trans isomérisation de la région PRR pourraient agencer les deux domaines NOA et UBZ idéalement afin de reconnaître de façon optimale de longues chaînes de poly-ubiquitine K63 (Figure 63).

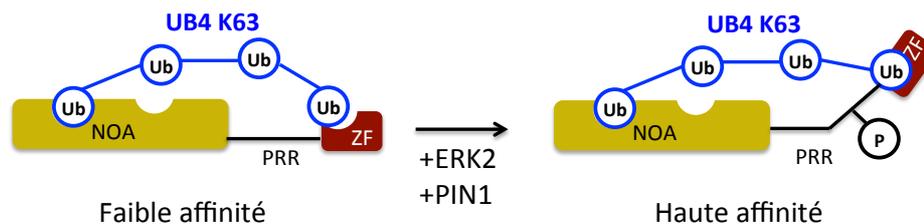


Figure 63 : Modèle moléculaire du gain d'affinité pour les chaînes K63 du domaine NOAZ médié par la phosphorylation du domaine PRR et son isomérisation

Les deux domaines NOA et UBZ peuvent reconnaître de longues chaînes d'ubiquitine K63 avec une faible affinité. La phosphorylation et l'isomérisation de la région PRR par ERK2 et PIN1 induisent un changement conformationnel afin d'agencer de façon optimale les deux UBDs de CEP55. Ceux-ci peuvent alors interagir avec une haute affinité pour les chaînes K63.

II) Rôles fonctionnels des UBDs de CEP55 dans la cytokinèse et la dégradation des midbody remnant

D'après Fabbro et ses collaborateurs [481], CEP55 est localisée au niveau du centrosome pendant l'interphase et se dissocie des centrosomes en début de prophase. Dans cette étude, aucun marquage de la protéine GFP-CEP55 n'a été observé au niveau des midbody remnant. Toutefois, dans nos conditions expérimentales nous n'avons pas observé de marquage centrosomal de CEP55 mais uniquement un marquage des midbody remnant. Nous avons en effet observé que tous les « dots » de CEP55 sont co-localisés avec les « dots » MKLP1 qui est un marqueur spécifique des midbody et des midbody remnant comme déjà décrit dans un grand nombre d'études [466, 469, 558]. Ces différents résultats pourraient provenir du fait que Fabbro et ses collaborateurs ont étudié la localisation cellulaire de CEP55 via la surexpression de la protéine de fusion GFP-CEP55 alors que dans nos conditions expérimentales, nous avons localisé la protéine CEP55 endogène en respectant son niveau d'expression physiologique à l'aide d'un anticorps spécifique par immunofluorescence.

Nous avons montré que les domaines NOA et UBZ de CEP55 sont importants dans la fonction portée par CEP55 dans la cytokinèse par une approche de complémentation fonctionnelle dans des cellules HeLa. Dans ces expériences, nous avons observé que l'expression ectopique de CEP55 WT conduit à une restauration significative mais partielle des défauts de cytokinèse induits par la déplétion de CEP55 endogène. Ceci a été observé malgré un niveau d'expression transitoire de CEP55 similaire à celui de l'endogène dans la fraction soluble. Alors que l'efficacité de transfection du siRNA dirigé contre CEP55 est élevée (niveau non détectable de CEP55 endogène par Western-Blot), l'efficacité de transfection des plasmides portant les gènes sauvage ou mutés de CEP55, résistants au siRNA, a pu être estimée à seulement 50 %, ce qui explique en grande partie cette restauration partielle. De plus, il a été décrit que la surexpression de CEP55 pouvait conduire à des défauts de cytokinèse qui sont toutefois moins sévères qu'une déplétion de CEP55 [481]. Les forts niveaux d'expression pour les protéines transitoirement exprimées et observées en grande partie dans la fraction insoluble de lysats cellulaires pourraient induire un certain niveau de défaut de cytokinèse. Enfin, on ne peut pas exclure que l'utilisation de deux transfusions successives de siRNA CEP55 accroît la sous-régulation de l'ARN messager codant CEP55,

mais peut aussi augmenter la non spécificité de ce siRNA et interférer avec d'autres ARNm codant des protéines "off-targets" qui pourraient contribuer au défaut de cytocinèse. Ainsi, le défaut de cytocinèse observé induit par la transfection de siRNA CEP55 pourrait ne pas être directement causée par la déplétion de CEP55.

A. La fonction du domaine NOA et son rôle en aval du recrutement de CEP55 au midbody

Les mutants du NOA qui ont été générés présentent des défauts drastiques d'interaction avec l'ubiquitine mais également une altération des propriétés de dimérisation. De façon surprenante, l'analyse sur gel SDS-PAGE en conditions non-réductrices des différents mutants du NOA a montré que le triple mutant présente un défaut de dimérisation plus élevé *in vitro* que le mutant D362R/F363P qui contient pourtant la proline agissant généralement comme "helix breaker" et déstabilisant les structures de type "coiled-coil" (cf. figure S8D de l'article). L'altération de la triple mutation L351A/Q354A/Q355A sur la dimérisation de NOA n'avait initialement pas été prédite dans notre modèle structural du domaine NOA en interaction avec des di-ubiquitines linéaires ou K63. Cependant, une étude plus poussée de minimisation énergétique par recuit simulé de l'apoforme du domaine NOA de CEP55 a finalement révélé que le groupement amine de la chaîne latérale de la glutamine 355 de chaque monomère peut former une liaison hydrogène stable avec l'atome de soufre de la méthionine 356 portée par l'autre monomère. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle la mutation Q355A au sein du triple mutant induit une forte déstabilisation du dimère.

Nous avons ainsi fait le choix de ne pas insérer la triple mutation L351A/Q354A/Q355A au sein de la protéine CEP55 entière et d'analyser uniquement la capacité de restauration fonctionnelle du double mutant D362R/F363P. Dans un contexte de protéine entière, il est probable que la proline 363 ne déstabilise que localement la structure "coiled-coil" dimérique du domaine NOA. Ceci a pu être observé pour le domaine NOA de la protéine NEMO qui contient une proline (P299 chez l'humain) qui crée une déstabilisation locale du « coiled-coil » dimérique sur uniquement les résidus 298 et 299 constituant la région « stammer » [142]. De plus, le domaine EABR de CEP55 nécessite d'être structuré en « coiled-coil » dimérique afin d'interagir avec ALIX. Or, le mutant D362R/F363P ne présente

pas de défaut de recrutement d'ALIX au midbody révélant que cette mutation n'affecte pas la structure globale du dimère "coiled-coil" de CEP55.

Dans le cas du domaine NOA, nos résultats révèlent que la dimérisation du domaine NOA et/ou la capacité d'interaction à l'ubiquitine sont importantes pour la fonction de CEP55 dans la cytokinèse. La génération de mutants dimériques stables uniquement altérés dans leur capacité à interagir avec l'ubiquitine devra permettre de mettre en évidence laquelle de ces propriétés est importante dans la cytokinèse. La mise à disposition récente de la structure cristallographique du complexe NOA de ABIN2 en interaction avec une tri-ubiquitine M1 pourra faciliter l'identifier de tels mutants.

Nous avons montré que le mutant D362R/F636P malgré un niveau d'expression comparable à CEP55 WT, présente des propriétés fonctionnelles étonnantes. De façon similaire à CEP55 WT, ce mutant est capable de restaurer le nombre de cellules multinucléées, phénotype qui peut être associé à des défauts de stabilité du pont intercellulaire. Néanmoins, il ne restaure pas le nombre de cellules séparées par un pont intercellulaire qui traduit un défaut spécifique d'abscission. Comme nous l'avons montré, ce mutant est normalement recruté au midbody et présente ainsi un rôle fonctionnel en aval de celui-ci.

CEP55 a été montré comme présentant une fonction déterminante dans le processus d'abscission en permettant le recrutement de la machinerie ESCRT au midbody. De plus, CEP55 joue également un rôle important dans la stabilisation du pont intercellulaire par son implication dans l'intégrité du midbody et dans la voie « NoCut » [356, 447]. Sur la base de ces observations, on pourrait imaginer que le domaine NOA de CEP55 soit spécifiquement impliqué dans l'étape d'abscission et ne soit pas important dans le rôle de CEP55 dans la stabilisation du pont intercellulaire. En accord avec cela, le mutant D362R/F636P recrute au midbody, de façon similaire à CEP55 WT, la protéine ALIX qui a été montrée comme ayant également un rôle important dans la stabilité du pont intercellulaire [357, 447].

La seule fonction validée de CEP55 dans l'abscission est de directement recruter les protéines ALIX et TSG101 au midbody permettant le recrutement des ESCRT-III au site d'abscission. Une hypothèse serait ainsi que ce mutant du NOA présente un défaut d'interaction à la protéine TSG101. En effet, contrairement à ALIX, TSG101 ne présente pas ce rôle de stabilisation du pont intercellulaire [447]. Ainsi le défaut d'abscission observé avec le mutant D362R/F636P pourrait provenir d'un défaut de recrutement de TSG101 au midbody. De façon intéressante, il a été décrit que TSG101 était ubiquitinée [559]. Ainsi, on pourrait imaginer que le domaine NOA renforce le complexe entre TSG101 et EABR de

façon dépendante de l'ubiquitine. De plus, il a été montré la présence d'un domaine EABR chez ABIN2 lui permettant d'interagir avec TSG101 [560] ce qui suggère qu'il pourrait exister un mécanisme conservé d'interaction couplée des domaines NOA et EABR afin d'interagir avec cette protéine. De plus, nous avons observé la présence d'une bande retardée de TSG101 pouvant correspondre à une forme mono-ubiquitinée de la protéine qui interagit avec CEP55 de façon indépendante du domaine ZF dans les expériences de « Pull-Down » avec des extraits cellulaires de cellules HeLa S3. Celle-ci pourrait interagir spécifiquement avec le domaine NOA de CEP55. Des expériences visant à quantifier le recrutement de TSG101 au midbody dans les expériences de complémentation fonctionnelle ont été réalisées. Toutefois, nous n'avons pas été en mesure de trouver des anticorps dirigés contre TSG101 suffisamment spécifiques. Il pourra être intéressant de transférer une protéine de fusion XFP-TSG101 dans les mêmes expériences de complémentation fonctionnelle, afin de déterminer si le recrutement de TSG101 pourrait être partiellement altéré spécifiquement pour le mutant D362R/F363P.

Par ailleurs, CEP55 a été également montré comme étant liée au trafic vésiculaire. Notamment, il a été montré que la déplétion de CEP55 conduisait à un défaut de localisation de VAMP8 au midbody bien que cela pourrait être dû au rôle structurel de CEP55 dans le maintien de l'intégrité du midbody [356]. VAMP8 qui appartient à la famille v-SNARE a été montrée comme étant importante dans le processus d'abscission. VAMP8 est localisée dans la région périphérique du midbody et dans la région flanquant le midbody. Cette protéine a été montrée comme étant ubiquitinylée par une à trois molécules d'ubiquitine [442]. De plus, les déubiquitinases impliquées dans l'abscission UBPY et AMSH, présentes au niveau du pont intercellulaire, régulent le niveau d'ubiquitination de cette protéine [442]. On pourrait ainsi imaginer que le domaine NOA de CEP55 soit important dans le recrutement de cette protéine au niveau du pont intercellulaire.

Concernant un rôle fonctionnel éventuel de NOA sur les midbody remnant, il est important de rappeler que le nombre de midbody remnant dans les cellules transitoirement reconstituées avec CEP55 WT ou le double mutant D362R/F363P était similaire. Cela suggère fortement que la dégradation des midbody remnant est indépendante du domaine NOA de CEP55.

B. Le domaine UBZ est crucial dans le recrutement de CEP55 au midbody

Les résultats obtenus au cours de ma thèse indiquent que le domaine UBZ de CEP55 est impliqué dans le recrutement spécifique de CEP55 au midbody de façon dépendante de son interaction avec l'ubiquitine.

L'approche de complémentation génétique par siRNA de remplacement du domaine UBZ de CEP55 par d'autres ZFs connus pour interagir avec l'ubiquitine a révélé que le test de complémentation dans les cellules HeLa n'était pas suffisamment sensible pour observer un recrutement significatif des chimères au niveau du midbody (données non montrées). La fenêtre temporelle de recrutement des différentes chimères pourrait être différente de celle de CEP55 WT. Les cellules ont été fixées 48 h post-transfection et il est possible que les différentes chimères présentent un retard de recrutement plus prononcé que le WT, d'autant plus qu'un certain nombre ZF utilisés sont connus pour fonctionner comme des domaines d'adressage spécifiques vers d'autres compartiments cellulaires. On peut également avancer l'hypothèse selon laquelle ces chimères sont recrutées efficacement au midbody, mais elles se dissocient plus facilement du midbody que le CEP55 sauvage. Afin de confirmer ou réfuter ces hypothèses, il serait intéressant de générer des protéines de fusion XFP avec les différentes chimères en respectant le niveau d'expression physiologique du CEP55 endogène, puis d'effectuer des expériences de vidéo-microscopie afin de suivre le recrutement au midbody des différentes chimères au cours du temps.

Afin d'augmenter la sensibilité de notre test de complémentation génétique, les expériences ont été réalisées dans des cellules U2OS invalidées pour le gène *CEP55* (*CEP55* K.O) dans des conditions de forte expression. Ces expériences ont montré que toutes les chimères sont recrutées au midbody de façon plus efficace que le mutant C440A/C443A confirmant que l'activité d'adressage du domaine UBZ de CEP55 est dépendante de son interaction avec l'ubiquitine *in cellula*. Ces résultats indiquent également que l'activité d'adressage du domaine UBZ de CEP55 au midbody n'est pas dépendante d'une interaction sélective pour les chaînes K63 ou pour les chaînes M1.

Il est important de noter qu'aucune des chimères ne présente une efficacité de recrutement au midbody aussi élevée que celle de la protéine CEP55 sauvage, à l'exception de la chimère UBZ RAD18. Ceci peut paraître surprenant pour la chimère contenant l'UBZ

de WRNIP1 car ce domaine présente un mode d'interaction à l'ubiquitine similaire à celui de CEP55. Toutefois, la constante d'affinité pour l'ubiquitine peut être un facteur important et celle de l'UBZ de WRNIP1 pourrait être plus faible que celle de l'UBZ de CEP55. Le domaine UBZ de RAD18 présente quant à lui une extension C-terminale lui conférant une meilleure affinité pour l'ubiquitine, ainsi qu'une préférence d'interaction pour les chaînes K63 comparées aux chaînes K48. Ces propriétés d'interaction de l'UBZ RAD18 pourraient fournir une base moléculaire rendant compte de la bonne efficacité de recrutement au midbody pour cette chimère.

Les cellules U20S *CEP55* K.O expriment la RFP nous empêchant d'effectuer par immunofluorescence un quadruple marquage de la tubuline, de CEP55, de MKLP1 et des noyaux comme celui réalisé pour les expériences de complémentation fonctionnelle dans les cellules HeLa. Un triple marquage de CEP55, de MKLP1 et des noyaux a donc été réalisé afin d'analyser le pourcentage de midbody totaux (midbody au sein d'un pont intercellulaire et midbody remnant) par cellule. Nos analyses préliminaires ont révélé que les différentes chimères ne restauraient que faiblement par rapport à CEP55 WT le nombre de midbody totaux par cellules dans les U20S, suggérant que les chimères pourraient présenter un défaut de restauration de la cytokinèse et de la dégradation des midbody remnant (non montré). Toutefois, des expériences complémentaires pourront être réalisées en marquant la tubuline et MKLP1 afin de pouvoir faire la distinction entre les midbody remnant et les midbody présents au sein d'un pont intercellulaire et pourraient confirmer le défaut fonctionnel des différentes chimères. Si ces résultats étaient effectivement confirmés, ce défaut fonctionnel pourrait être dû à une plus faible efficacité de recrutement des chimères au niveau du midbody mais également à une cinétique de recrutement des différentes chimères au midbody qui pourrait être différente de celle de CEP55 WT.

Par ailleurs, la protéine de fusion GFP-ZF^{CEP55} est spécifiquement recrutée au midbody montrant que ce domaine porte tous les déterminants pour permettre le recrutement spécifique de CEP55 au midbody. L'ensemble de nos résultats suggère ainsi que le domaine UBZ de CEP55 présente une spécificité fonctionnelle par rapport aux autres UBDs de type ZF utilisés. En accord avec cela, les protéines endogènes WRNIP1, RAD18, NDP52, TAB2 et A20 ne présentent pas de localisation au midbody.

Comme décrit précédemment, le domaine UBZ de CEP55 présente la plus forte homologie d'un point de vue structural avec la sous-famille UBZ WRNIP1/RAD18, mais pourrait présenter quelques différences et spécificités structurales. On pourrait ainsi imaginer que le domaine UBZ de CEP55 présente un mode d'interaction particulier à l'ubiquitine qui

lui confère sa spécificité fonctionnelle. Le résidu E440 de CEP55 qui n'est pas présent chez WRNIP1 et RAD18 pourrait être un début d'explication à la spécificité du mode d'interaction à l'ubiquitine de l'UBZ de CEP55.

Une autre hypothèse supposerait que le domaine UBZ de CEP55 présente des déterminants spécifiques qui seraient sujets à des modifications post-traductionnelles pouvant moduler l'activité du domaine UBZ. Cette régulation de l'activité d'interaction à l'ubiquitine durant la mitose et la cytokinèse pourrait être importante pour la fonction du domaine UBZ de CEP55.

Par exemple, la tyrosine 461 et la sérine 463 qui sont présentes dans l'UBZ de CEP55 ont été identifiées comme étant phosphorylées dans un grand nombre d'études de protéomique. La phosphorylation de ces résidus pourrait moduler l'interaction à l'ubiquitine et on pourrait imaginer que cette régulation soit importante dans la fonction d'adressage au midbody.

Enfin, il est également possible que certains déterminants spécifiques de l'UBZ de CEP55 soient impliqués dans l'interaction avec une autre protéine cellulaire non encore identifiée. Ainsi, l'interaction du domaine UBZ de CEP55 à l'ubiquitine et à cette protéine seraient nécessaires pour permettre un recrutement total de CEP55 au midbody.

CEP55 est recruté au niveau du midbody en fin de télophase et nous avons montré que ce recrutement était dépendant du domaine UBZ et de sa capacité à interagir avec l'ubiquitine. Néanmoins, nous n'avons pas réussi à identifier la protéine ubiquitinée reconnue par CEP55 qui pourrait jouer un rôle d'adressage de CEP55 au midbody. Comme décrit dans l'introduction, les interactions entre les domaines UBDs et l'ubiquitine sont généralement labiles et interviennent souvent par coopérativité pour stabiliser des complexes existants rendant difficile l'identification des partenaires ubiquitinés.

Le domaine UBZ de CEP55 présente une spécificité fonctionnelle comparée aux autres UBZs utilisés dans les différentes protéines chimères. Différentes hypothèses ont été formulées pouvant expliquer cette spécificité fonctionnelle dans le paragraphe précédent. Un modèle du recrutement de CEP55 basé sur l'hypothèse selon laquelle le domaine UBZ pourrait reconnaître également une autre protéine cellulaire est proposé ici.

MKLP1 a été décrite comme présentant un rôle important de recrutement de CEP55 au midbody. En effet la déplétion de cette protéine par siRNA conduit à un défaut de recrutement de CEP55 au niveau du midbody [356]. MKLP1 au sein du complexe Centralspindlin (en interaction avec MgcRacGap) est une protéine qui forme une structure multimérique présente au niveau de la plaque équatoriale en anaphase et est localisée au niveau du midbody dès la

formation de celui-ci. De plus, cette protéine a été montrée comme étant ubiquitinylée [452] faisant de cette protéine un potentiel candidat qui pourrait être reconnu par le domaine UBZ de CEP55 afin de permettre le recrutement de CEP55 au midbody. Le domaine C-terminal de CEP55 (résidus 230-464) qui contient l'UBZ de CEP55 a été montré comme interagissant (directement ou indirectement) avec MKLP1 [356]. Nos résultats de « pull-down » à partir d'extraits cellulaires montrent une interaction directe ou indirecte de la protéine CEP55 WT avec MKLP1 de façon dépendante du domaine UBZ (cf. figure 57B). Néanmoins, aucune forme ubiquitinylée de MKLP1 n'a été observée dans nos conditions expérimentales. On pourrait supposer que le domaine UBZ de CEP55 soit un domaine de reconnaissance à la fois à MKLP1 et à l'ubiquitine, deux propriétés distinctes qui permettraient le recrutement optimal de CEP55 au midbody. Cette protéine ubiquitinylée pourrait être une fraction de MKLP1 que nous n'avons pas réussi à identifier dans nos conditions expérimentales ou une autre protéine non identifiée complexée à MKLP1.

Par ailleurs, la sérine 436 qui est présente juste en amont du brin β 1 de l'UBZ de CEP55, et qui a été décrite comme étant phosphorylée par la kinase PLK1, pourrait réguler l'activité d'interaction à l'ubiquitine du domaine UBZ de CEP55. En effet, l'ajout d'un groupement polaire et chargé sur la sérine 436 pourrait déstabiliser l'interaction avec le patch hydrophobe de l'ubiquitine centré autour de l'Ile44. Ceci pourrait être confirmé *in vitro* en générant un peptide mimant l'UBZ de CEP55 phosphomimétique S436E et en réalisant des expériences de polarisation de fluorescence et d'interférométrie sur bio-couche avec de l'ubiquitine purifiée. De façon intéressante, lorsque PLK1 est inactivée, CEP55 est recrutée de façon précoce au niveau de la plaque équatoriale en anaphase [482]. Cela suggère que la protéine ubiquitinylée pourrait être présente au niveau de la plaque équatoriale en anaphase. MKLP1 remplit également cette condition. Lorsque PLK1 est dégradée en sortie de mitose, CEP55 est déphosphorylée sur son site S436 pouvant ainsi activer le domaine UBZ qui peut alors interagir avec l'ubiquitine. L'UBZ de CEP55 pourrait alors reconnaître la protéine ubiquitinée X complexée à MKLP1. L'ancrage de CEP55 au midbody pourrait être alors stabilisé par une interaction supplémentaire entre l'UBZ de CEP55 et MKLP1 et ainsi permettre un recrutement optimal de CEP55 au niveau du midbody (figure 64).

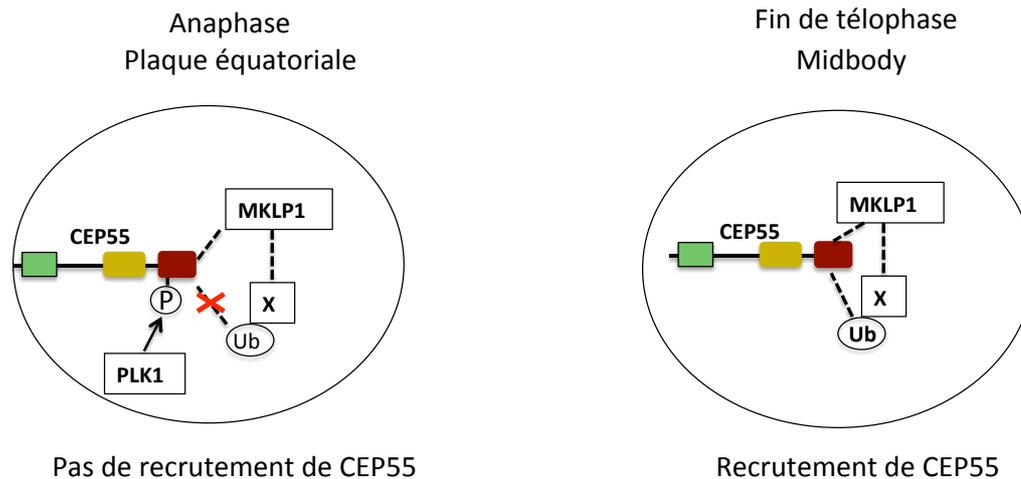


Figure 64 : Modèle de recrutement de CEP55 basé sur une reconnaissance du domaine UBZ à une protéine ubiquitinée X non-identifiée et à MKLP1

Le recrutement de CEP55 au niveau de la plaque équatoriale est dépendant de l'interaction du domaine UBZ à une protéine non identifiée (notée X) ubiquitinée qui pourrait être MKLP1 elle-même ou une autre protéine complexée à MKLP1. La phosphorylation de la sérine 436 par PLK1 inhibe l'interaction entre l'UBZ et l'ubiquitine et empêche le recrutement précoce de CEP55 au niveau de la plaque équatoriale durant l'anaphase. En fin de télophase, la sérine 436 est déphosphorylée et le domaine UBZ de CEP55 est alors activé. Celui-ci interagit avec la protéine X ubiquitinée et le complexe est stabilisé par une interaction avec MKLP1 permettant une efficacité de recrutement optimale de CEP55 au midbody.

Pour valider cette hypothèse de travail, il serait intéressant de purifier la protéine MKLP1 et d'étudier l'interaction directe de l'UBZ de CEP55 avec MKLP1. Si une différence d'interaction de MKLP1 avec le mutant E460A (incapable d'interagir avec l'ubiquitine) et le mutant C440A/C443A (incapable de se replier en UBZ) est observée, cela pourra fortement suggérer que le domaine UBZ contient des déterminants d'interaction distincts pour interagir avec l'ubiquitine et MKLP1.

Par ailleurs, de nombreuses études de protéomique ont montré que CEP55 était ubiquitinée. Toutefois, nous n'avons jamais observé dans nos conditions expérimentales de forme ubiquitinée de CEP55. Cette forme ubiquitinée de CEP55 non identifiée pourrait permettre d'amplifier le recrutement de CEP55 au midbody via son domaine UBZ.

C. Le domaine UBZ de CEP55 aurait-il un rôle en aval du recrutement de CEP55 au midbody ?

Comme nous l'avons montré, les mutants du domaine UBZ de CEP55 sont accompagnés d'un défaut de recrutement de CEP55 au midbody ce qui est associé à une perte de fonction totale de CEP55 dans la cytokinèse mais également dans la dégradation des midbody remnant. On peut néanmoins envisager qu'une fois CEP55 recrutée au midbody, le domaine UBZ puisse jouer un rôle dans l'abscission et dans la dégradation des midbody remnant.

Les expériences de « pull-down » à partir d'extraits cellulaires montrent une interaction (directe ou indirecte) préférentielle de CEP55 WT avec des formes non-ubiquitinées d'ALIX et de TSG101 comparée au mutant C440A/C433A. Ceci suggère que le domaine UBZ stabilise les contacts EABR/GPPX₃Y de façon indirecte par la reconnaissance de protéines ubiquitinées au midbody. Des expériences préliminaires conduites par notre collaborateur E. Laplantine ont montré une co-immunoprécipitation entre CEP55 et les protéines MKLP1, ALIX et TSG101 bien qu'aucune forme ubiquitinée de ces protéines n'ait été observée (résultats non montrés). De façon intéressante, un traitement des protéines co-immunoprécipitées avec une déubiquitinase non spécifique et hautement active (v-OTU) conduit à une forte déstabilisation des complexes. On pourrait ainsi imaginer que le domaine UBZ contribue à la stabilité d'un assemblage protéique comprenant MKLP1, ALIX, TSG101 et CEP55 au niveau du midbody, et ce afin d'ancrer de façon stable les différents composants au sein du midbody. Comme décrit dans l'introduction, de nombreuses évidences montrent que ces différentes protéines pourraient former un réseau protéique ordonné et très organisé au niveau du midbody. Celui-ci pourrait être stabilisé en partie par des contacts entre les UBDs d'ALIX, de TSG101 et l'UBZ de CEP55 avec des protéines ubiquitinées non encore identifiées au niveau du midbody. Le domaine NOA, quant à lui, pourrait contribuer à cette stabilisation du réseau en interagissant avec une forme ubiquitinée de TSG101. De plus, la forme ubiquitinylée de CEP55 décrite dans différentes études de protéomique pourrait permettre de favoriser un assemblage multimérique de CEP55 via ses UBDs au niveau du midbody mais également de renforcer l'interaction avec ALIX et TSG101 qui présentent également des UBDs.

Par ailleurs, de manière similaire à celle décrite pour le domaine NOA, le domaine UBZ de CEP55 pourrait jouer un rôle dans le recrutement au midbody de la protéine VAMP8 qui a été décrite comme étant ubiquitinée.

Les résultats obtenus sous-tendent également l'idée selon laquelle l'UBZ de CEP55, contrairement au domaine NOA, est impliqué dans la dégradation des midbody remnant. Ces résultats sont à mettre en parallèle avec ceux de la littérature où il a été montré que les midbody remnant sont en partie dégradés par autophagie selon un processus qui est dépendant de l'ubiquitine. De plus, l'activité de l'ubiquitine ligase TRAF6 a été montrée comme étant importante dans ce processus autophagique et pourrait ubiquityler MKLP1 [475]. Une analyse bio-informatique n'a pas révélé de présence de séquence LIR type (LC3 interacting motif) chez CEP55, contrairement par exemple à d'autres récepteurs d'autophagie comme NDP52 ou OPTINEURIN [561, 562]. Nonobstant, nous avons observé que la boucle reliant le brin $\beta 2$ et l'hélice α de l'UBZ de CEP55 (résidus YPATE) présente un motif conservé avec les UBZs de NDP52 (résidus FPATE). On pourrait s'interroger sur le rôle de cette séquence qui pourrait être un motif d'interaction à une protéine importante pour induire l'autophagie. C'est d'ailleurs cette même boucle portant cette fois le motif PPXY au sein des UBZs de TAX1BP1 qui permet de recruter l'E3-ligase ITCH pour terminer l'activation de la NF- κ B et éviter ainsi une réponse inflammatoire chronique[563].

D. Rôle fonctionnel de la coopérativité des domaines NOA et UBZ ainsi que de leur régulation

Nos résultats indiquent que la coopérativité du domaine NOAZ observé *in vitro* avec de longues chaînes d'ubiquitine K63 ne semble pas être un mécanisme impliqué dans le recrutement de CEP55 au midbody car le cas échéant le mutant du domaine NOA incapable d'interagir avec l'ubiquitine ne serait pas recruté au midbody. Le même raisonnement peut être appliqué pour la dégradation des midbody remnant. Néanmoins, ces deux domaines pourraient interagir de façon coopérative au niveau du midbody afin de reconnaître de longues chaînes d'ubiquitine K63. La stabilisation d'un réseau ubiquitine dépendant entre MKLP1, CEP55, ALIX et TSG101 pourrait notamment faire intervenir une protéine non identifiée qui serait poly-ubiquitinée par des chaînes K63. De façon intéressante, PIN1 a été

montrée comme étant recrutée au midbody et régulerait en partie la fonction portée par CEP55 durant la cytokinèse [488]. Ainsi, on pourrait envisager que la protéine CEP55 phosphorylée par CDK1/ERK2 en début de mitose sur les S425 et 428 interagisse de façon coopérative avec de longues chaînes d'ubiquitine K63 portées par une protéine non identifiée au midbody. PIN1 alors localisée au midbody favoriserait une forme de haute affinité du domaine NOAZ pour les chaînes K63. PIN1 pourrait ainsi contribuer en partie à la fonction portée par CEP55 durant la cytokinèse au niveau du midbody comme cela l'a été proposé [488].

E. Quelles sont les enzymes associées à l'ubiquitome qui pourraient être impliquées dans la fonction de CEP55 au midbody ?

La mise en évidence de la présence d'UBDs de CEP55 qui sont impliqués dans l'abscission suggère l'existence d'enzymes de l'ubiquitome (E1, E2, E3 et DUB) pouvant réguler ce processus. Une campagne de criblage visant à déterminer les enzymes de la signalisation de l'ubiquitine impliquées dans l'abscission a été réalisée en collaboration avec L. Davignon qui effectuait son stage post-doctoral dans le laboratoire. Une banque de siRNA dirigée contre 600 E3-ligases et déubiquitinases dans des cellules HeLa a été réalisée et le nombre de cellules séparées par un pont intercellulaire a été quantifié par un triple marquage incluant la tubuline, MKLP1 et CEP55.

De façon intéressante, quinze gènes candidats qui sont majoritairement des E3-ligases ont été identifiés comme étant potentiellement impliqués dans l'abscission. Aucun des gènes identifiés ne correspond à des E3-ligases ou déubiquitinases préalablement décrits dans la littérature comme intervenant dans la cytokinèse. Ceci pourrait résulter de notre "read out" si particulier dans notre test phénotypique de criblage qui est basé sur le nombre de cellules séparées par un pont intercellulaire (phénotype lié à des retards d'abscission) et non pas sur le nombre de cellules multinucléées comme la plupart des tests de criblage effectués auparavant sur la cytokinèse. En outre, deux de ces candidats qui sont des E3-ligases semblent jouer un rôle spécifique dans le recrutement de CEP55 au midbody. Une campagne de criblage secondaire afin de valider l'implication dans l'abscission des différents candidats est actuellement en cours de réalisation.

III) Implications des UBDs de CEP55 dans d'autres fonctions cellulaires et dans les pathologies associées à CEP55

L'identification de nouveaux UBDs dans la protéine CEP55 soulève la question d'éventuelles implications de ces UBDs dans d'autres fonctions connues de CEP55.

Notamment, il a pu être montré que la phosphorylation par PLK1 de la S436 stabilisait CEP55 durant la mitose qui serait alors moins sujette à la dégradation par le protéasome. Cela suggère un rôle potentiel du domaine UBZ dans la stabilité de CEP55 et que ce domaine pourrait faciliter la dégradation de CEP55 en mitose par le protéasome [489, 534].

Par ailleurs, il pourrait être intéressant d'étudier le rôle de ces UBDs dans la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR. CEP55 a été décrite comme interagissant de façon directe ou indirecte avec la sous-unité catalytique d'Akt p110 [504]. De plus, l'interaction entre ces deux protéines pourrait être déclenchée par VEGF-A, entraînant une relocalisation de CEP55 sous la membrane plasmique [505]. De façon intéressante, la régulation de la localisation d'Akt sous la membrane plasmique est dépendante de sa poly-ubiquitination par des chaînes de poly-ubiquitine K63 qui peuvent notamment être médiées par l'E3 ligase TRAF6 [501-503]. CEP55 pourrait ainsi interagir avec Akt en interagissant avec ces chaînes de poly-ubiquitine. De plus, il a été montré que CEP55 pourrait stabiliser la protéine Akt en inhibant sa dégradation par le protéasome notamment chez le poisson zèbre [507]. Le rôle protecteur de stabilisation de cette sous-unité pourrait également être dépendant des UBDs de CEP55 d'autant plus qu'une protéine CEP55 tronquée pour l'UBZ est incapable de restaurer fonctionnellement des défauts de développement embryonnaire dus à l'inactivation du gène *CEP55* chez cet organisme modèle [483].

Le pouvoir oncogénique et métastatique de CEP55 probablement liés à la fonction de CEP55 dans la cytokinèse et dans la voie de signalisation Akt pourraient ainsi dépendre des domaines NOA et UBZ de CEP55.

Finalement, il a été décrit récemment deux pathologies létales embryonnaires nommées Meckel-like et MARCH (Multinucleated neurons, Anhydramnios, Renal dysplasia, Cerebellar hypoplasia and Hydranencephaly) [483, 540]. Les principaux symptômes observés sont des malformations au niveau du cerveau, une dysplasie rénale, une polydactylie ainsi que la présence d'un nombre de neurones multinucléés important. Dans le cas de MARCH,

l'étiologie est causée par une troncation des 40 résidus C-terminaux de CEP55 correspondant à une délétion du domaine UBZ de CEP55. Le rôle indispensable du domaine UBZ dans la cytokinèse permettrait notamment d'expliquer la présence d'un nombre anormal de cellules multinucléées qui se manifestent dans le cerveau. De plus, le syndrome Meckel-Gruber est une ciliopathie pouvant conduire à une dysplasie rénale, à une polydactylie et à des malformations du système nerveux [540, 564]. Les symptômes observés pour les syndrômes Meckel-like et MARCH se rapprochent de ceux décrits dans cette ciliopathie suggérant que CEP55 pourrait jouer un rôle dans le fonctionnement du cil primaire [540].

De plus, CEP55 a été décrite comme présentant à la fois une localisation au centrosome et au niveau des midbody remnant. Or le centrosome joue un rôle indispensable dans la formation et la fonction du cil primaire [565] et une étude récente a montré que les midbody remnant pourraient également avoir un rôle déterminant dans la formation du cil primaire [558]. Comme nous l'avons montré, un défaut fonctionnel du domaine UBZ est accompagné d'une augmentation du nombre de midbody remnant. L'implication d'une dérégulation du nombre de midbody remnant dans la fonction du cil primaire n'a pas été mise en évidence mais pourrait être une piste explicative à un dysfonctionnement du cil primaire causé par une délétion de l'UBZ de CEP55. L'identification de patients présentant des mutations sur le domaine NOA ou UBZ de CEP55 pourra être entreprise dans le futur afin de comprendre le rôle des UBDs de CEP55 dans le développement de telles pathologies.

BIBLIOGRAPHIE

1. Schoenheimer, R., *The Dynamic State of Body Constituents*. 1942: Harvard University Press.
2. de Duve, C.G., R.; Appelmans, F. & Wattiaux, R., *Enzymic content of the mitochondria fraction*. *Nature*, 1953. **172**: p. 1143-1144.
3. de Duve, C.W., R. , *Functions of lysosomes*. *Annu. Rev. Physiol.*, 1966. **28**: p. 435-492.
4. Poole, B., Ohkuma, S. & Warburton, M. J., *Protein Turnover and Lysosome Function*. Academic, 1978: p. 43-58.
5. Etlinger, J.D. and A.L. Goldberg, *A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(1): p. 54-8.
6. Ciechanover, A., Hod, Y. & Hershko, A., *A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1978. **81**: p. 1100-1105.
7. Ciechanover, A., et al., *ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(3): p. 1365-8.
8. Hershko, A., et al., *Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(4): p. 1783-6.
9. Ciechanover, A., et al., *Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes*. *J Biol Chem*, 1980. **255**(16): p. 7525-8.
10. Wilkinson, D., Urban, M. K. & Haas, A. L., *Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes*. *J. Biol. Chem*, 1980. **255**: p. 7529–7532.
11. Goldknopf, I.L. and H. Busch, *Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977. **74**(3): p. 864-8.

12. de Napoles, M., et al., *Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation*. Dev Cell, 2004. **7**(5): p. 663-76.
13. Zuin, A., M. Isasa, and B. Crosas, *Ubiquitin signaling: extreme conservation as a source of diversity*. Cells, 2014. **3**(3): p. 690-701.
14. Hershko, A., et al., *Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown*. J Biol Chem, 1983. **258**(13): p. 8206-14.
15. Hough, R., G. Pratt, and M. Rechsteiner, *Ubiquitin-lysozyme conjugates. Identification and characterization of an ATP-dependent protease from rabbit reticulocyte lysates*. J Biol Chem, 1986. **261**(5): p. 2400-8.
16. Waxman, L., J.M. Fagan, and A.L. Goldberg, *Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates*. J Biol Chem, 1987. **262**(6): p. 2451-7.
17. Spence, J., et al., *A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(3): p. 1265-73.
18. Chen, Z.J., L. Parent, and T. Maniatis, *Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity*. Cell, 1996. **84**(6): p. 853-62.
19. Schwanhausser, B., et al., *Global quantification of mammalian gene expression control*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 337-42.
20. Kulak, N.A., et al., *Minimal, encapsulated proteomic-sample processing applied to copy-number estimation in eukaryotic cells*. Nat Methods, 2014. **11**(3): p. 319-24.
21. Hicke, L. and H. Riezman, *Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis*. Cell, 1996. **84**(2): p. 277-87.
22. Katzmann, D.J., M. Babst, and S.D. Emr, *Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I*. Cell, 2001. **106**(2): p. 145-55.
23. Ciechanover, A. and R. Ben-Saadon, *N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(3): p. 103-6.
24. Ravid, T. and M. Hochstrasser, *Autoregulation of an E2 enzyme by ubiquitin-chain assembly on its catalytic residue*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(4): p. 422-7.
25. Wang, X., et al., *Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3*. J Cell Biol, 2007. **177**(4): p. 613-24.
26. Pickart, C.M., *Mechanisms underlying ubiquitination*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 503-33.

27. Komander, D., M.J. Clague, and S. Urbe, *Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(8): p. 550-63.
28. Ikeda, F. and I. Dikic, *Atypical ubiquitin chains: new molecular signals*. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. EMBO Rep, 2008. **9**(6): p. 536-42.
29. Iwai, K. and F. Tokunaga, *Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-kappaB activation*. EMBO Rep, 2009. **10**(7): p. 706-13.
30. Jin, J., et al., *Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1135-8.
31. Ye, Y. and M. Rape, *Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(11): p. 755-64.
32. Li, W., et al., *Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1487.
33. Schulman, B.A. and J.W. Harper, *Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(5): p. 319-31.
34. Yang, X., et al., *Absolute quantification of E1, ubiquitin-like proteins and Nedd8-MLN4924 adduct by mass spectrometry*. Cell Biochem Biophys, 2013. **67**(1): p. 139-47.
35. Deshaies, R.J. and C.A. Joazeiro, *RING domain E3 ubiquitin ligases*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 399-434.
36. Zheng, N., et al., *Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases*. Cell, 2000. **102**(4): p. 533-9.
37. Dominguez, C., et al., *Structural model of the UbcH5B/CNOT4 complex revealed by combining NMR, mutagenesis, and docking approaches*. Structure, 2004. **12**(4): p. 633-44.
38. Buetow, L., et al., *Activation of a primed RING E3-E2-ubiquitin complex by non-covalent ubiquitin*. Mol Cell, 2015. **58**(2): p. 297-310.
39. Mace, P.D., et al., *Structures of the cIAP2 RING domain reveal conformational changes associated with ubiquitin-conjugating enzyme (E2) recruitment*. J Biol Chem, 2008. **283**(46): p. 31633-40.
40. Yin, Q., et al., *E2 interaction and dimerization in the crystal structure of TRAF6*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(6): p. 658-66.
41. Plechanovova, A., et al., *Mechanism of ubiquitylation by dimeric RING ligase RNF4*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(9): p. 1052-9.

42. Lydeard, J.R., B.A. Schulman, and J.W. Harper, *Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases*. EMBO Rep, 2013. **14**(12): p. 1050-61.
43. Petroski, M.D. and R.J. Deshaies, *Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 9-20.
44. Rotin, D. and S. Kumar, *Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(6): p. 398-409.
45. Huang, L., et al., *Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade*. Science, 1999. **286**(5443): p. 1321-6.
46. Kamadurai, H.B., et al., *Insights into ubiquitin transfer cascades from a structure of a UbcH5B approximately ubiquitin-HECT(NEDD4L) complex*. Mol Cell, 2009. **36**(6): p. 1095-102.
47. Ranaweera, R.S. and X. Yang, *Auto-ubiquitination of Mdm2 enhances its substrate ubiquitin ligase activity*. J Biol Chem, 2013. **288**(26): p. 18939-46.
48. Smit, J.J. and T.K. Sixma, *RBR E3-ligases at work*. EMBO Rep, 2014. **15**(2): p. 142-54.
49. Spratt, D.E., H. Walden, and G.S. Shaw, *RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions*. Biochem J, 2014. **458**(3): p. 421-37.
50. Wenzel, D.M., et al., *UBCH7 reactivity profile reveals parkin and HHARI to be RING/HECT hybrids*. Nature, 2011. **474**(7349): p. 105-8.
51. Stieglitz, B., et al., *Structural basis for ligase-specific conjugation of linear ubiquitin chains by HOIP*. Nature, 2013. **503**(7476): p. 422-6.
52. Smit, J.J., et al., *The E3 ligase HOIP specifies linear ubiquitin chain assembly through its RING-IBR-RING domain and the unique LDD extension*. EMBO J, 2012. **31**(19): p. 3833-44.
53. Mevissen, T.E., et al., *OTU deubiquitinases reveal mechanisms of linkage specificity and enable ubiquitin chain restriction analysis*. Cell, 2013. **154**(1): p. 169-84.
54. Hospenthal, M.K., T.E. Mevissen, and D. Komander, *Deubiquitinase-based analysis of ubiquitin chain architecture using Ubiquitin Chain Restriction (UbiCRest)*. Nat Protoc, 2015. **10**(2): p. 349-61.
55. Edelmann, M.J., et al., *Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination*. Biochem J, 2009. **418**(2): p. 379-90.
56. Wang, T., et al., *Evidence for bidentate substrate binding as the basis for the K48 linkage specificity of otubain 1*. J Mol Biol, 2009. **386**(4): p. 1011-23.
57. McCullough, J., M.J. Clague, and S. Urbe, *AMSH is an endosome-associated ubiquitin isopeptidase*. J Cell Biol, 2004. **166**(4): p. 487-92.

58. Bremm, A., S.M. Freund, and D. Komander, *Lys11-linked ubiquitin chains adopt compact conformations and are preferentially hydrolyzed by the deubiquitinase Cezanne*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(8): p. 939-47.
59. Keusekotten, K., et al., *OTULIN antagonizes LUBAC signaling by specifically hydrolyzing Met1-linked polyubiquitin*. *Cell*, 2013. **153**(6): p. 1312-26.
60. Fiil, B.K., et al., *OTULIN restricts Met1-linked ubiquitination to control innate immune signaling*. *Mol Cell*, 2013. **50**(6): p. 818-30.
61. Virdee, S., et al., *Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase*. *Nat Chem Biol*, 2010. **6**(10): p. 750-7.
62. Licchesi, J.D., et al., *An ankyrin-repeat ubiquitin-binding domain determines TRABID's specificity for atypical ubiquitin chains*. *Nat Struct Mol Biol*, 2011. **19**(1): p. 62-71.
63. Finley, D., *Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome*. *Annu Rev Biochem*, 2009. **78**: p. 477-513.
64. Lork, M., K. Verhelst, and R. Beyaert, *CYLD, A20 and OTULIN deubiquitinases in NF-kappaB signaling and cell death: so similar, yet so different*. *Cell Death Differ*, 2017.
65. Damgaard, R.B., et al., *The Deubiquitinase OTULIN Is an Essential Negative Regulator of Inflammation and Autoimmunity*. *Cell*, 2016. **166**(5): p. 1215-1230 e20.
66. Sowa, M.E., et al., *Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape*. *Cell*, 2009. **138**(2): p. 389-403.
67. Wertz, I.E., et al., *De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling*. *Nature*, 2004. **430**(7000): p. 694-9.
68. Newton, K., et al., *Ubiquitin chain editing revealed by polyubiquitin linkage-specific antibodies*. *Cell*, 2008. **134**(4): p. 668-78.
69. Lin, S.C., et al., *Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF-kappaB inhibitor A20*. *J Mol Biol*, 2008. **376**(2): p. 526-40.
70. Vijay-Kumar, S., C.E. Bugg, and W.J. Cook, *Structure of ubiquitin refined at 1.8 A resolution*. *J Mol Biol*, 1987. **194**(3): p. 531-44.
71. Lange, O.F., et al., *Recognition dynamics up to microseconds revealed from an RDC-derived ubiquitin ensemble in solution*. *Science*, 2008. **320**(5882): p. 1471-5.
72. Dikic, I., S. Wakatsuki, and K.J. Walters, *Ubiquitin-binding domains - from structures to functions*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(10): p. 659-71.
73. Shih, S.C., K.E. Sloper-Mould, and L. Hicke, *Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors*. *EMBO J*, 2000. **19**(2): p. 187-98.

74. Sloper-Mould, K.E., et al., *Distinct functional surface regions on ubiquitin*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 30483-9.
75. Reyes-Turcu, F.E., et al., *The ubiquitin binding domain ZnF UBP recognizes the C-terminal diglycine motif of unanchored ubiquitin*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1197-208.
76. Rahighi, S., et al., *Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation*. Cell, 2009. **136**(6): p. 1098-109.
77. Jin, L., et al., *Mechanism of ubiquitin-chain formation by the human anaphase-promoting complex*. Cell, 2008. **133**(4): p. 653-65.
78. Cook, W.J., et al., *Structure of a diubiquitin conjugate and a model for interaction with ubiquitin conjugating enzyme (E2)*. J Biol Chem, 1992. **267**(23): p. 16467-71.
79. Alfano, C., S. Faggiano, and A. Pastore, *The Ball and Chain of Polyubiquitin Structures*. Trends Biochem Sci, 2016. **41**(4): p. 371-85.
80. Komander, D., et al., *Molecular discrimination of structurally equivalent Lys 63-linked and linear polyubiquitin chains*. EMBO Rep, 2009. **10**(5): p. 466-73.
81. Kristariyanto, Y.A., et al., *K29-selective ubiquitin binding domain reveals structural basis of specificity and heterotypic nature of k29 polyubiquitin*. Mol Cell, 2015. **58**(1): p. 83-94.
82. Michel, M.A., et al., *Assembly and specific recognition of k29- and k33-linked polyubiquitin*. Mol Cell, 2015. **58**(1): p. 95-109.
83. Kristariyanto, Y.A., et al., *Assembly and structure of Lys33-linked polyubiquitin reveals distinct conformations*. Biochem J, 2015. **467**(2): p. 345-52.
84. Varadan, R., et al., *Structural properties of polyubiquitin chains in solution*. J Mol Biol, 2002. **324**(4): p. 637-47.
85. Tenno, T., et al., *Structural basis for distinct roles of Lys63- and Lys48-linked polyubiquitin chains*. Genes Cells, 2004. **9**(10): p. 865-75.
86. Trempe, J.F., et al., *A new crystal form of Lys48-linked diubiquitin*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2010. **66**(Pt 9): p. 994-8.
87. Hirano, T., et al., *Conformational dynamics of wild-type Lys-48-linked diubiquitin in solution*. J Biol Chem, 2011. **286**(43): p. 37496-502.
88. Lai, M.Y., et al., *Structural and biochemical studies of the open state of Lys48-linked diubiquitin*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(11): p. 2046-56.
89. Ryabov, Y. and D. Fushman, *Interdomain mobility in di-ubiquitin revealed by NMR*. Proteins, 2006. **63**(4): p. 787-96.
90. Varadan, R., et al., *Structural determinants for selective recognition of a Lys48-linked polyubiquitin chain by a UBA domain*. Mol Cell, 2005. **18**(6): p. 687-98.

91. Cook, W.J., et al., *Structure of tetraubiquitin shows how multiubiquitin chains can be formed*. J Mol Biol, 1994. **236**(2): p. 601-9.
92. Phillips, C.L., et al., *Structure of a new crystal form of tetraubiquitin*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2001. **57**(Pt 2): p. 341-4.
93. Eddins, M.J., et al., *Crystal structure and solution NMR studies of Lys48-linked tetraubiquitin at neutral pH*. J Mol Biol, 2007. **367**(1): p. 204-11.
94. Satoh, T., et al., *Crystal structure of cyclic Lys48-linked tetraubiquitin*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **400**(3): p. 329-33.
95. Varadan, R., et al., *Solution conformation of Lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 7055-63.
96. Weeks, S.D., et al., *Crystal structures of Lys-63-linked tri- and di-ubiquitin reveal a highly extended chain architecture*. Proteins, 2009. **77**(4): p. 753-9.
97. Datta, A.B., G.L. Hura, and C. Wolberger, *The structure and conformation of Lys63-linked tetraubiquitin*. J Mol Biol, 2009. **392**(5): p. 1117-24.
98. Castaneda, C.A., et al., *Unique structural, dynamical, and functional properties of K11-linked polyubiquitin chains*. Structure, 2013. **21**(7): p. 1168-81.
99. Matsumoto, M.L., et al., *K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody*. Mol Cell, 2010. **39**(3): p. 477-84.
100. Hurley, J.H., S. Lee, and G. Prag, *Ubiquitin-binding domains*. Biochem J, 2006. **399**(3): p. 361-72.
101. Husnjak, K. and I. Dikic, *Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 291-322.
102. Fisher, R.D., et al., *Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 28976-84.
103. Swanson, K.A., L. Hicke, and I. Radhakrishnan, *Structural basis for monoubiquitin recognition by the Ede1 UBA domain*. J Mol Biol, 2006. **358**(3): p. 713-24.
104. Penengo, L., et al., *Crystal structure of the ubiquitin binding domains of rabex-5 reveals two modes of interaction with ubiquitin*. Cell, 2006. **124**(6): p. 1183-95.
105. Lee, S., et al., *Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(3): p. 264-71.
106. Yamashita, Y., et al., *Ubiquitin-independent binding of Hrs mediates endosomal sorting of the interleukin-2 receptor beta-chain*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 10): p. 1727-38.
107. Bienko, M., et al., *Ubiquitin-binding domains in Y-family polymerases regulate translesion synthesis*. Science, 2005. **310**(5755): p. 1821-4.

108. He, F., et al., *Myosin VI Contains a Compact Structural Motif that Binds to Ubiquitin Chains*. Cell Rep, 2016. **14**(11): p. 2683-94.
109. Hofmann, K. and P. Bucher, *The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway*. Trends Biochem Sci, 1996. **21**(5): p. 172-3.
110. Ohtake, F., et al., *The K48-K63 Branched Ubiquitin Chain Regulates NF-kappaB Signaling*. Mol Cell, 2016. **64**(2): p. 251-266.
111. Trempe, J.F., et al., *Mechanism of Lys48-linked polyubiquitin chain recognition by the Mud1 UBA domain*. EMBO J, 2005. **24**(18): p. 3178-89.
112. Raasi, S., et al., *Diverse polyubiquitin interaction properties of ubiquitin-associated domains*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(8): p. 708-14.
113. Matta-Camacho, E., et al., *Atypical binding of the Swa2p UBA domain to ubiquitin*. J Mol Biol, 2009. **386**(2): p. 569-77.
114. Shih, S.C., et al., *A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain*. EMBO J, 2003. **22**(6): p. 1273-81.
115. Prag, G., et al., *Mechanism of ubiquitin recognition by the CUE domain of Vps9p*. Cell, 2003. **113**(5): p. 609-20.
116. Kang, R.S., et al., *Solution structure of a CUE-ubiquitin complex reveals a conserved mode of ubiquitin binding*. Cell, 2003. **113**(5): p. 621-30.
117. Ponting, C.P., *Proteins of the endoplasmic-reticulum-associated degradation pathway: domain detection and function prediction*. Biochem J, 2000. **351 Pt 2**: p. 527-35.
118. Bilodeau, P.S., et al., *The GAT domains of clathrin-associated GGA proteins have two ubiquitin binding motifs*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54808-16.
119. Prag, G., et al., *Structural mechanism for ubiquitinated-cargo recognition by the Golgi-localized, gamma-ear-containing, ADP-ribosylation-factor-binding proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(7): p. 2334-9.
120. Dowlatshahi, D.P., et al., *ALIX is a Lys63-specific polyubiquitin binding protein that functions in retrovirus budding*. Dev Cell, 2012. **23**(6): p. 1247-54.
121. Pashkova, N., et al., *The yeast Alix homolog Bro1 functions as a ubiquitin receptor for protein sorting into multivesicular endosomes*. Dev Cell, 2013. **25**(5): p. 520-33.
122. Keren-Kaplan, T., et al., *Structure-based in silico identification of ubiquitin-binding domains provides insights into the ALIX-V:ubiquitin complex and retrovirus budding*. EMBO J, 2013. **32**(4): p. 538-51.
123. Ren, X. and J.H. Hurley, *VHS domains of ESCRT-0 cooperate in high-avidity binding to polyubiquitinated cargo*. EMBO J, 2010. **29**(6): p. 1045-54.

124. Lange, A., et al., *NMR reveals a different mode of binding of the Stam2 VHS domain to ubiquitin and diubiquitin*. *Biochemistry*, 2011. **50**(1): p. 48-62.
125. Mizuno, E., et al., *STAM proteins bind ubiquitinated proteins on the early endosome via the VHS domain and ubiquitin-interacting motif*. *Mol Biol Cell*, 2003. **14**(9): p. 3675-89.
126. Brzovic, P.S., et al., *A UbcH5/ubiquitin noncovalent complex is required for processive BRCA1-directed ubiquitination*. *Mol Cell*, 2006. **21**(6): p. 873-80.
127. Sundquist, W.I., et al., *Ubiquitin recognition by the human TSG101 protein*. *Mol Cell*, 2004. **13**(6): p. 783-9.
128. Slagsvold, T., et al., *Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(20): p. 19600-6.
129. Husnjak, K., et al., *Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor*. *Nature*, 2008. **453**(7194): p. 481-8.
130. Schreiner, P., et al., *Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction*. *Nature*, 2008. **453**(7194): p. 548-52.
131. Bellare, P., et al., *Ubiquitin binding by a variant Jab1/MPN domain in the essential pre-mRNA splicing factor Prp8p*. *RNA*, 2006. **12**(2): p. 292-302.
132. Fu, Q.S., et al., *Structural basis for ubiquitin recognition by a novel domain from human phospholipase A2-activating protein*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(28): p. 19043-52.
133. He, Y., L. Hicke, and I. Radhakrishnan, *Structural basis for ubiquitin recognition by SH3 domains*. *J Mol Biol*, 2007. **373**(1): p. 190-6.
134. Song, A.X., et al., *Solution structure of the N-terminal domain of DC-UbP/UBTD2 and its interaction with ubiquitin*. *Protein Sci*, 2010. **19**(5): p. 1104-9.
135. Sato, Y., et al., *Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by NZF domains of TAB2 and TAB3*. *EMBO J*, 2009. **28**(24): p. 3903-9.
136. Laplantine, E., et al., *NEMO specifically recognizes K63-linked poly-ubiquitin chains through a new bipartite ubiquitin-binding domain*. *EMBO J*, 2009. **28**(19): p. 2885-95.
137. Zhang, X., et al., *An Interaction Landscape of Ubiquitin Signaling*. *Mol Cell*, 2017. **65**(5): p. 941-955 e8.
138. Sims, J.J. and R.E. Cohen, *Linkage-specific avidity defines the lysine 63-linked polyubiquitin-binding preference of rap80*. *Mol Cell*, 2009. **33**(6): p. 775-83.
139. Wagner, S., et al., *Ubiquitin binding mediates the NF-kappaB inhibitory potential of ABIN proteins*. *Oncogene*, 2008. **27**(26): p. 3739-45.

140. Lo, Y.C., et al., *Structural basis for recognition of diubiquitins by NEMO*. Mol Cell, 2009. **33**(5): p. 602-15.
141. Tokunaga, F., et al., *Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(2): p. 123-32.
142. Grubisha, O., et al., *DARPin-assisted crystallography of the CC2-LZ domain of NEMO reveals a coupling between dimerization and ubiquitin binding*. J Mol Biol, 2010. **395**(1): p. 89-104.
143. Nakazawa, S., et al., *Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12547.
144. Lin, S.M., et al., *Structural Insights into Linear Tri-ubiquitin Recognition by A20-Binding Inhibitor of NF-kappaB, ABIN-2*. Structure, 2017. **25**(1): p. 66-78.
145. Cordier, F., et al., *The zinc finger of NEMO is a functional ubiquitin-binding domain*. J Biol Chem, 2009. **284**(5): p. 2902-7.
146. Ngadjewa, F., et al., *Two-sided ubiquitin binding of NF-kappaB essential modulator (NEMO) zinc finger unveiled by a mutation associated with anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency syndrome*. J Biol Chem, 2013. **288**(47): p. 33722-37.
147. Dubosclard, V., E. Fontan, and F. Agou, *Use of fluorescence spectroscopy for quantitative investigations of ubiquitin interactions with the ubiquitin-binding domains of NEMO*. Methods Mol Biol, 2015. **1280**: p. 321-37.
148. Coleman, J.E., *Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins*. Annu Rev Biochem, 1992. **61**: p. 897-946.
149. Miller, J., A.D. McLachlan, and A. Klug, *Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from Xenopus oocytes*. EMBO J, 1985. **4**(6): p. 1609-14.
150. Klug, A. and J.W. Schwabe, *Protein motifs 5. Zinc fingers*. FASEB J, 1995. **9**(8): p. 597-604.
151. Andreini, C., et al., *Counting the zinc-proteins encoded in the human genome*. J Proteome Res, 2006. **5**(1): p. 196-201.
152. Malgieri, G., et al., *The prokaryotic zinc-finger: structure, function and comparison with the eukaryotic counterpart*. FEBS J, 2015. **282**(23): p. 4480-96.
153. Kelly, S.M., et al., *Recognition of polyadenosine RNA by zinc finger proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(30): p. 12306-11.
154. Gaullier, J.M., et al., *FYVE fingers bind PtdIns(3)P*. Nature, 1998. **394**(6692): p. 432-3.
155. Gamsjaeger, R., et al., *Sticky fingers: zinc-fingers as protein-recognition motifs*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(2): p. 63-70.

156. Leon, O. and M. Roth, *Zinc fingers: DNA binding and protein-protein interactions*. Biol Res, 2000. **33**(1): p. 21-30.
157. Krishna, S.S., I. Majumdar, and N.V. Grishin, *Structural classification of zinc fingers: survey and summary*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(2): p. 532-50.
158. Gill, D.J., et al., *Structural insight into the ESCRT-I/-II link and its role in MVB trafficking*. EMBO J, 2007. **26**(2): p. 600-12.
159. Alam, S.L., et al., *Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers*. EMBO J, 2004. **23**(7): p. 1411-21.
160. Sato, Y., et al., *Specific recognition of linear ubiquitin chains by the Npl4 zinc finger (NZF) domain of the HOIL-1L subunit of the linear ubiquitin chain assembly complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(51): p. 20520-5.
161. Kulathu, Y., et al., *Two-sided ubiquitin binding explains specificity of the TAB2 NZF domain*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(12): p. 1328-30.
162. Shiba, T., et al., *Molecular mechanism of membrane recruitment of GGA by ARF in lysosomal protein transport*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(5): p. 386-93.
163. Bosanac, I., et al., *Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF-kappaB signaling*. Mol Cell, 2010. **40**(4): p. 548-57.
164. Tokunaga, F., et al., *Specific recognition of linear polyubiquitin by A20 zinc finger 7 is involved in NF-kappaB regulation*. EMBO J, 2012. **31**(19): p. 3856-70.
165. Acharya, N., et al., *DNA polymerase eta lacking the ubiquitin-binding domain promotes replicative lesion bypass in humans cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(23): p. 10401-5.
166. Williams, H.L., M.E. Gottesman, and J. Gautier, *Replication-independent repair of DNA interstrand crosslinks*. Mol Cell, 2012. **47**(1): p. 140-7.
167. McIntyre, J., et al., *Ubiquitin mediates the physical and functional interaction between human DNA polymerases eta and iota*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(3): p. 1649-60.
168. Crosetto, N., et al., *Human Wrnip1 is localized in replication factories in a ubiquitin-binding zinc finger-dependent manner*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 35173-85.
169. Suzuki, N., et al., *A novel mode of ubiquitin recognition by the ubiquitin-binding zinc finger domain of WRNIP1*. FEBS J, 2016. **283**(11): p. 2004-17.
170. Saugar, I., et al., *The genome maintenance factor Mgs1 is targeted to sites of replication stress by ubiquitylated PCNA*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(1): p. 245-57.
171. Notenboom, V., et al., *Functional characterization of Rad18 domains for Rad6, ubiquitin, DNA binding and PCNA modification*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(17): p. 5819-30.

172. Huang, J., et al., *RAD18 transmits DNA damage signalling to elicit homologous recombination repair*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(5): p. 592-603.
173. Thach, T.T., et al., *Molecular determinants of polyubiquitin recognition by continuous ubiquitin-binding domains of Rad18*. Biochemistry, 2015. **54**(12): p. 2136-48.
174. Shereda, R.D., Y. Machida, and Y.J. Machida, *Human KIAA1018/FAN1 localizes to stalled replication forks via its ubiquitin-binding domain*. Cell Cycle, 2010. **9**(19): p. 3977-83.
175. Ali, A.M., et al., *FAAP20: a novel ubiquitin-binding FA nuclear core-complex protein required for functional integrity of the FA-BRCA DNA repair pathway*. Blood, 2012. **119**(14): p. 3285-94.
176. Wojtaszek, J.L., et al., *Ubiquitin recognition by FAAP20 expands the complex interface beyond the canonical UBZ domain*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(22): p. 13997-4005.
177. Toma, A., et al., *Structural basis for ubiquitin recognition by ubiquitin-binding zinc finger of FAAP20*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120887.
178. Yang, K., G.L. Moldovan, and A.D. D'Andrea, *RAD18-dependent recruitment of SNM1A to DNA repair complexes by a ubiquitin-binding zinc finger*. J Biol Chem, 2010. **285**(25): p. 19085-91.
179. Lachaud, C., et al., *Distinct functional roles for the two SLX4 ubiquitin-binding UBZ domains mutated in Fanconi anemia*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 13): p. 2811-7.
180. Yamamoto, K.N., et al., *Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(16): p. 6492-6.
181. Centore, R.C., et al., *Spartan/C1orf124, a reader of PCNA ubiquitylation and a regulator of UV-induced DNA damage response*. Mol Cell, 2012. **46**(5): p. 625-35.
182. Mosbech, A., et al., *DVCI (C1orf124) is a DNA damage-targeting p97 adaptor that promotes ubiquitin-dependent responses to replication blocks*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(11): p. 1084-92.
183. Davis, E.J., et al., *DVCI (C1orf124) recruits the p97 protein segregase to sites of DNA damage*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(11): p. 1093-100.
184. Tumbarello, D.A., et al., *The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of Salmonella Typhimurium by Autophagy*. PLoS Pathog, 2015. **11**(10): p. e1005174.
185. Thurston, T.L., et al., *Recruitment of TBK1 to cytosol-invading Salmonella induces WIPI2-dependent antibacterial autophagy*. EMBO J, 2016. **35**(16): p. 1779-92.
186. Xie, X., et al., *Molecular basis of ubiquitin recognition by the autophagy receptor CALCOCO2*. Autophagy, 2015. **11**(10): p. 1775-89.

187. Bomar, M.G., et al., *Structure of the ubiquitin-binding zinc finger domain of human DNA Y-polymerase eta*. EMBO Rep, 2007. **8**(3): p. 247-51.
188. Rizzo, A.A., et al., *NMR structure of the human Rad18 zinc finger in complex with ubiquitin defines a class of UBZ domains in proteins linked to the DNA damage response*. Biochemistry, 2014. **53**(37): p. 5895-906.
189. Sims, J.J., et al., *Avid interactions underlie the Lys63-linked polyubiquitin binding specificities observed for UBA domains*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(8): p. 883-9.
190. Kohler, A., et al., *Structural basis for assembly and activation of the heterotetrameric SAGA histone H2B deubiquitinase module*. Cell, 2010. **141**(4): p. 606-17.
191. Ouyang, H., et al., *Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini*. J Biol Chem, 2012. **287**(4): p. 2317-27.
192. Clague, M.J., C. Heride, and S. Urbe, *The demographics of the ubiquitin system*. Trends Cell Biol, 2015. **25**(7): p. 417-26.
193. Kaiser, S.E., et al., *Protein standard absolute quantification (PSAQ) method for the measurement of cellular ubiquitin pools*. Nat Methods, 2011. **8**(8): p. 691-6.
194. Joo, H.Y., et al., *Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination*. Nature, 2007. **449**(7165): p. 1068-72.
195. Wu, T., et al., *UBE2S drives elongation of K11-linked ubiquitin chains by the anaphase-promoting complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1355-60.
196. Kim, W., et al., *Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome*. Mol Cell, 2011. **44**(2): p. 325-40.
197. Emanuele, M.J., et al., *Global identification of modular cullin-RING ligase substrates*. Cell, 2011. **147**(2): p. 459-74.
198. Komander, D. and M. Rape, *The ubiquitin code*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 203-29.
199. Kravtsova-Ivantsiv, Y., S. Cohen, and A. Ciechanover, *Modification by single ubiquitin moieties rather than polyubiquitination is sufficient for proteasomal processing of the p105 NF-kappaB precursor*. Mol Cell, 2009. **33**(4): p. 496-504.
200. Shabek, N., et al., *The size of the proteasomal substrate determines whether its degradation will be mediated by mono- or polyubiquitylation*. Mol Cell, 2012. **48**(1): p. 87-97.
201. Livneh, I., et al., *Monoubiquitination joins polyubiquitination as an esteemed proteasomal targeting signal*. Bioessays, 2017. **39**(6).
202. Wang, H., et al., *Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing*. Nature, 2004. **431**(7010): p. 873-8.

203. Hoegge, C., et al., *RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO*. Nature, 2002. **419**(6903): p. 135-41.
204. Machida, Y.J., et al., *UBE2T is the E2 in the Fanconi anemia pathway and undergoes negative autoregulation*. Mol Cell, 2006. **23**(4): p. 589-96.
205. Mukhopadhyay, D. and H. Riezman, *Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling*. Science, 2007. **315**(5809): p. 201-5.
206. Peng, J., et al., *A proteomics approach to understanding protein ubiquitination*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(8): p. 921-6.
207. Xu, P., et al., *Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation*. Cell, 2009. **137**(1): p. 133-45.
208. Petroski, M.D. and R.J. Deshaies, *Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34*. Cell, 2005. **123**(6): p. 1107-20.
209. Chen, B., et al., *The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(2): p. 341-6.
210. Flick, K., et al., *A ubiquitin-interacting motif protects polyubiquitinated Met4 from degradation by the 26S proteasome*. Nat Cell Biol, 2006. **8**(5): p. 509-15.
211. Min, M., et al., *Efficient APC/C substrate degradation in cells undergoing mitotic exit depends on K11 ubiquitin linkages*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(24): p. 4325-32.
212. Bremm, A., et al., *Cezanne (OTUD7B) regulates HIF-1alpha homeostasis in a proteasome-independent manner*. EMBO Rep, 2014. **15**(12): p. 1268-77.
213. Moniz, S., et al., *Cezanne regulates E2F1-dependent HIF2alpha expression*. J Cell Sci, 2015. **128**(16): p. 3082-93.
214. Chen, Z.J. and L.J. Sun, *Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling*. Mol Cell, 2009. **33**(3): p. 275-86.
215. Kulathu, Y. and D. Komander, *Atypical ubiquitylation - the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(8): p. 508-23.
216. Wang, C., et al., *TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK*. Nature, 2001. **412**(6844): p. 346-51.
217. Deng, L., et al., *Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain*. Cell, 2000. **103**(2): p. 351-61.
218. Doil, C., et al., *RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins*. Cell, 2009. **136**(3): p. 435-46.

219. Stewart, G.S., et al., *The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage*. Cell, 2009. **136**(3): p. 420-34.
220. Gack, M.U., et al., *TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity*. Nature, 2007. **446**(7138): p. 916-920.
221. Song, E.J., et al., *The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome*. Genes Dev, 2010. **24**(13): p. 1434-47.
222. Spence, J., et al., *Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain*. Cell, 2000. **102**(1): p. 67-76.
223. Kirkin, V., et al., *A role for ubiquitin in selective autophagy*. Mol Cell, 2009. **34**(3): p. 259-69.
224. Raiborg, C. and H. Stenmark, *The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins*. Nature, 2009. **458**(7237): p. 445-52.
225. Xia, Z.P., et al., *Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains*. Nature, 2009. **461**(7260): p. 114-9.
226. Zeng, W., et al., *Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity*. Cell, 2010. **141**(2): p. 315-30.
227. Noad, J., et al., *LUBAC-synthesized linear ubiquitin chains restrict cytosol-invading bacteria by activating autophagy and NF-kappaB*. Nat Microbiol, 2017. **2**: p. 17063.
228. van Wijk, S.J.L., et al., *Linear ubiquitination of cytosolic Salmonella Typhimurium activates NF-kappaB and restricts bacterial proliferation*. Nat Microbiol, 2017. **2**: p. 17066.
229. Cunningham, C.N., et al., *USP30 and parkin homeostatically regulate atypical ubiquitin chains on mitochondria*. Nat Cell Biol, 2015. **17**(2): p. 160-9.
230. Durcan, T.M., et al., *USP8 regulates mitophagy by removing K6-linked ubiquitin conjugates from parkin*. EMBO J, 2014. **33**(21): p. 2473-91.
231. Srivastava, D. and O. Chakrabarti, *Mahogunin-mediated alpha-tubulin ubiquitination via noncanonical K6 linkage regulates microtubule stability and mitotic spindle orientation*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1064.
232. Elia, A.E., et al., *Quantitative Proteomic Atlas of Ubiquitination and Acetylation in the DNA Damage Response*. Mol Cell, 2015. **59**(5): p. 867-81.
233. Gatti, M., et al., *RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage*. Cell Rep, 2015. **10**(2): p. 226-38.
234. Palicharla, V.R. and S. Maddika, *HACE1 mediated K27 ubiquitin linkage leads to YB-1 protein secretion*. Cell Signal, 2015. **27**(12): p. 2355-62.

235. Liu, Z., et al., *Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression*. *Cancer Cell*, 2014. **26**(1): p. 106-20.
236. You, J. and C.M. Pickart, *A HECT domain E3 enzyme assembles novel polyubiquitin chains*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(23): p. 19871-8.
237. Kim, D.Y., et al., *Advanced proteomic analyses yield a deep catalog of ubiquitylation targets in Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013. **25**(5): p. 1523-40.
238. Yuan, W.C., et al., *K33-Linked Polyubiquitination of Coronin 7 by Cul3-KLHL20 Ubiquitin E3 Ligase Regulates Protein Trafficking*. *Mol Cell*, 2014. **54**(4): p. 586-600.
239. Miao, Y., J. Wu, and S.N. Abraham, *Ubiquitination of Innate Immune Regulator TRAF3 Orchestrates Expulsion of Intracellular Bacteria by Exocyst Complex*. *Immunity*, 2016. **45**(1): p. 94-105.
240. Tran, H., et al., *Trabid, a new positive regulator of Wnt-induced transcription with preference for binding and cleaving K63-linked ubiquitin chains*. *Genes Dev*, 2008. **22**(4): p. 528-42.
241. Jin, J., et al., *Epigenetic regulation of the expression of Il12 and Il23 and autoimmune inflammation by the deubiquitinase Trabid*. *Nat Immunol*, 2016. **17**(3): p. 259-68.
242. Ordureau, A., et al., *Defining roles of PARKIN and ubiquitin phosphorylation by PINK1 in mitochondrial quality control using a ubiquitin replacement strategy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(21): p. 6637-42.
243. Ordureau, A., et al., *Quantitative proteomics reveal a feedforward mechanism for mitochondrial PARKIN translocation and ubiquitin chain synthesis*. *Mol Cell*, 2014. **56**(3): p. 360-75.
244. Sarraf, S.A., et al., *Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization*. *Nature*, 2013. **496**(7445): p. 372-6.
245. Thrower, J.S., et al., *Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal*. *EMBO J*, 2000. **19**(1): p. 94-102.
246. Lu, Y., et al., *Substrate degradation by the proteasome: a single-molecule kinetic analysis*. *Science*, 2015. **348**(6231): p. 1250834.
247. Emmerich, C.H., et al., *Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(38): p. 15247-52.
248. Grice, G.L., et al., *The Proteasome Distinguishes between Heterotypic and Homotypic Lysine-11-Linked Polyubiquitin Chains*. *Cell Rep*, 2015. **12**(4): p. 545-53.
249. Meyer, H.J. and M. Rape, *Enhanced protein degradation by branched ubiquitin chains*. *Cell*, 2014. **157**(4): p. 910-21.
250. Yau, R.G., et al., *Assembly and Function of Heterotypic Ubiquitin Chains in Cell-Cycle and Protein Quality Control*. *Cell*, 2017. **171**(4): p. 918-933 e20.

251. Yau, R. and M. Rape, *The increasing complexity of the ubiquitin code*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(6): p. 579-86.
252. Swatek, K.N. and D. Komander, *Ubiquitin modifications*. Cell Res, 2016. **26**(4): p. 399-422.
253. Boname, J.M., et al., *Efficient internalization of MHC I requires lysine-11 and lysine-63 mixed linkage polyubiquitin chains*. Traffic, 2010. **11**(2): p. 210-20.
254. Lee, H.J., et al., *Quantitative analysis of phosphopeptides in search of the disease biomarker from the hepatocellular carcinoma specimen*. Proteomics, 2009. **9**(12): p. 3395-408.
255. Zhou, H., et al., *Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome*. J Proteome Res, 2013. **12**(1): p. 260-71.
256. Lundby, A., et al., *Quantitative maps of protein phosphorylation sites across 14 different rat organs and tissues*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 876.
257. Swaney, D.L., et al., *Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation*. Nat Methods, 2013. **10**(7): p. 676-82.
258. Rikova, K., et al., *Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer*. Cell, 2007. **131**(6): p. 1190-203.
259. Olsen, J.V., et al., *Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks*. Cell, 2006. **127**(3): p. 635-48.
260. Choudhary, C., et al., *Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions*. Science, 2009. **325**(5942): p. 834-40.
261. Lundby, A., et al., *Proteomic analysis of lysine acetylation sites in rat tissues reveals organ specificity and subcellular patterns*. Cell Rep, 2012. **2**(2): p. 419-31.
262. Ohtake, F., et al., *Ubiquitin acetylation inhibits polyubiquitin chain elongation*. EMBO Rep, 2015. **16**(2): p. 192-201.
263. Weinert, B.T., et al., *Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation*. Cell Rep, 2013. **4**(4): p. 842-51.
264. Jin, S.M., et al., *Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL*. J Cell Biol, 2010. **191**(5): p. 933-42.
265. Narendra, D.P., et al., *PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin*. PLoS Biol, 2010. **8**(1): p. e1000298.
266. Koyano, F., et al., *Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin*. Nature, 2014. **510**(7503): p. 162-6.
267. Lazarou, M., et al., *The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy*. Nature, 2015. **524**(7565): p. 309-14.

268. Heo, J.M., et al., *The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy*. Mol Cell, 2015. **60**(1): p. 7-20.
269. Wauer, T., et al., *Ubiquitin Ser65 phosphorylation affects ubiquitin structure, chain assembly and hydrolysis*. EMBO J, 2015. **34**(3): p. 307-25.
270. Swaney, D.L., R.A. Rodriguez-Mias, and J. Villen, *Phosphorylation of ubiquitin at Ser65 affects its polymerization, targets, and proteome-wide turnover*. EMBO Rep, 2015. **16**(9): p. 1131-44.
271. Bhogaraju, S., et al., *Phosphoribosylation of Ubiquitin Promotes Serine Ubiquitination and Impairs Conventional Ubiquitination*. Cell, 2016. **167**(6): p. 1636-1649 e13.
272. Lamoliatte, F., et al., *Targeted identification of SUMOylation sites in human proteins using affinity enrichment and paralog-specific reporter ions*. Mol Cell Proteomics, 2013. **12**(9): p. 2536-50.
273. Hendriks, I.A., et al., *Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(10): p. 927-36.
274. Galisson, F., et al., *A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(2): p. M110 004796.
275. Uzunova, K., et al., *Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates*. J Biol Chem, 2007. **282**(47): p. 34167-75.
276. Bianconi, E., et al., *An estimation of the number of cells in the human body*. Ann Hum Biol, 2013. **40**(6): p. 463-71.
277. Meijer, L., *Le cycle de division cellulaire et sa régulation*. Bulletin du cancer, 2006.
278. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
279. Jones, S.M. and A. Kazlauskas, *Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression*. Chem Rev, 2001. **101**(8): p. 2413-23.
280. Rath, O. and F. Kozielski, *Kinesins and cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(8): p. 527-39.
281. di Pietro, F., A. Echard, and X. Morin, *Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view*. EMBO Rep, 2016. **17**(8): p. 1106-30.
282. Satyanarayana, A. and P. Kaldis, *Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms*. Oncogene, 2009. **28**(33): p. 2925-39.
283. Murray, A.W., *Recycling the cell cycle: cyclins revisited*. Cell, 2004. **116**(2): p. 221-34.

284. Hartwell, L.H. and T.A. Weinert, *Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events*. Science, 1989. **246**(4930): p. 629-34.
285. Khodjakov, A. and J. Pines, *Centromere tension: a divisive issue*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(10): p. 919-23.
286. Mierzwa, B. and D.W. Gerlich, *Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control*. Dev Cell, 2014. **31**(5): p. 525-38.
287. Green, R.A., E. Paluch, and K. Oegema, *Cytokinesis in animal cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012. **28**: p. 29-58.
288. Glotzer, M., *The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(1): p. 9-20.
289. Uehara, R., et al., *The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(17): p. 6998-7003.
290. Uehara, R. and G. Goshima, *Functional central spindle assembly requires de novo microtubule generation in the interchromosomal region during anaphase*. J Cell Biol, 2010. **191**(2): p. 259-67.
291. Kamasaki, T., et al., *Augmin-dependent microtubule nucleation at microtubule walls in the spindle*. J Cell Biol, 2013. **202**(1): p. 25-33.
292. Bieling, P., I.A. Telley, and T. Surrey, *A minimal midzone protein module controls formation and length of antiparallel microtubule overlaps*. Cell, 2010. **142**(3): p. 420-32.
293. Cundell, M.J., et al., *The BEG (PP2A-B55/ENSA/Greatwall) pathway ensures cytokinesis follows chromosome separation*. Mol Cell, 2013. **52**(3): p. 393-405.
294. Jiang, W., et al., *PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis*. Mol Cell, 1998. **2**(6): p. 877-85.
295. Mollinari, C., et al., *PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone*. J Cell Biol, 2002. **157**(7): p. 1175-86.
296. Neef, R., et al., *Cooperation between mitotic kinesins controls the late stages of cytokinesis*. Curr Biol, 2006. **16**(3): p. 301-7.
297. Subramanian, R., et al., *Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein*. Cell, 2010. **142**(3): p. 433-43.
298. Zhu, C., et al., *Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6196-201.
299. Mishima, M., S. Kaitna, and M. Glotzer, *Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity*. Dev Cell, 2002. **2**(1): p. 41-54.

300. Pavicic-Kaltenbrunner, V., M. Mishima, and M. Glotzer, *Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex*. Mol Biol Cell, 2007. **18**(12): p. 4992-5003.
301. Mishima, M., et al., *Cell cycle regulation of central spindle assembly*. Nature, 2004. **430**(7002): p. 908-13.
302. Guse, A., M. Mishima, and M. Glotzer, *Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis*. Curr Biol, 2005. **15**(8): p. 778-86.
303. Douglas, M.E., et al., *Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis*. Curr Biol, 2010. **20**(10): p. 927-33.
304. Hutterer, A., M. Glotzer, and M. Mishima, *Clustering of centralspindlin is essential for its accumulation to the central spindle and the midbody*. Curr Biol, 2009. **19**(23): p. 2043-9.
305. Carmena, M., et al., *The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(12): p. 789-803.
306. Hummer, S. and T.U. Mayer, *Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex*. Curr Biol, 2009. **19**(7): p. 607-12.
307. Krupina, K., et al., *Ubiquitin Receptor Protein UBASH3B Drives Aurora B Recruitment to Mitotic Microtubules*. Dev Cell, 2016. **36**(1): p. 63-78.
308. Nunes Bastos, R., et al., *Aurora B suppresses microtubule dynamics and limits central spindle size by locally activating KIF4A*. J Cell Biol, 2013. **202**(4): p. 605-21.
309. Bringmann, H. and A.A. Hyman, *A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 731-4.
310. Dechant, R. and M. Glotzer, *Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation*. Dev Cell, 2003. **4**(3): p. 333-44.
311. Bement, W.M., H.A. Benink, and G. von Dassow, *A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification*. J Cell Biol, 2005. **170**(1): p. 91-101.
312. Yuce, O., A. Piekny, and M. Glotzer, *An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA*. J Cell Biol, 2005. **170**(4): p. 571-82.
313. Foe, V.E. and G. von Dassow, *Stable and dynamic microtubules coordinately shape the myosin activation zone during cytokinetic furrow formation*. J Cell Biol, 2008. **183**(3): p. 457-70.
314. Werner, M., E. Munro, and M. Glotzer, *Astral signals spatially bias cortical myosin recruitment to break symmetry and promote cytokinesis*. Curr Biol, 2007. **17**(15): p. 1286-97.

315. Canman, J.C., et al., *Determining the position of the cell division plane*. Nature, 2003. **424**(6952): p. 1074-8.
316. Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer, *GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins*. Cell, 2007. **129**(5): p. 865-77.
317. Burkard, M.E., et al., *Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells*. PLoS Biol, 2009. **7**(5): p. e1000111.
318. Petronczki, M., et al., *Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle*. Dev Cell, 2007. **12**(5): p. 713-25.
319. Wolfe, B.A., et al., *Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCyk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation*. PLoS Biol, 2009. **7**(5): p. e1000110.
320. Su, K.C., T. Takaki, and M. Petronczki, *Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis*. Dev Cell, 2011. **21**(6): p. 1104-15.
321. Bastos, R.N., et al., *CYK4 inhibits Rac1-dependent PAK1 and ARHGEF7 effector pathways during cytokinesis*. J Cell Biol, 2012. **198**(5): p. 865-80.
322. Loria, A., K.M. Longhini, and M. Glotzer, *The RhoGAP domain of CYK-4 has an essential role in RhoA activation*. Curr Biol, 2012. **22**(3): p. 213-9.
323. Miller, A.L. and W.M. Bement, *Regulation of cytokinesis by Rho GTPase flux*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(1): p. 71-7.
324. Canman, J.C., et al., *Inhibition of Rac by the GAP activity of centralspindlin is essential for cytokinesis*. Science, 2008. **322**(5907): p. 1543-6.
325. Glotzer, M., *Cytokinesis in Metazoa and Fungi*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(10).
326. Kosako, H., et al., *Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow*. Oncogene, 2000. **19**(52): p. 6059-64.
327. Castrillon, D.H. and S.A. Wasserman, *Diaphanous is required for cytokinesis in Drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene*. Development, 1994. **120**(12): p. 3367-77.
328. Watanabe, S., et al., *mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(5): p. 2328-38.
329. Chang, F., D. Drubin, and P. Nurse, *cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin*. J Cell Biol, 1997. **137**(1): p. 169-82.

330. Watanabe, N., et al., *p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin*. EMBO J, 1997. **16**(11): p. 3044-56.
331. Matsumura, F., *Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(7): p. 371-7.
332. Carvalho, A., A. Desai, and K. Oegema, *Structural memory in the contractile ring makes the duration of cytokinesis independent of cell size*. Cell, 2009. **137**(5): p. 926-37.
333. Calvert, M.E., et al., *Myosin concentration underlies cell size-dependent scalability of actomyosin ring constriction*. J Cell Biol, 2011. **195**(5): p. 799-813.
334. Field, C.M. and B.M. Alberts, *Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex*. J Cell Biol, 1995. **131**(1): p. 165-78.
335. Piekny, A.J. and M. Glotzer, *Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis*. Curr Biol, 2008. **18**(1): p. 30-6.
336. Straight, A.F., C.M. Field, and T.J. Mitchison, *Anillin binds nonmuscle myosin II and regulates the contractile ring*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): p. 193-201.
337. Sun, L., et al., *Mechanistic insights into the anchorage of the contractile ring by anillin and Mid1*. Dev Cell, 2015. **33**(4): p. 413-26.
338. Chen, Q. and T.D. Pollard, *Actin filament severing by cofilin is more important for assembly than constriction of the cytokinetic contractile ring*. J Cell Biol, 2011. **195**(3): p. 485-98.
339. Mostowy, S. and P. Cossart, *Septins: the fourth component of the cytoskeleton*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(3): p. 183-94.
340. Mavrakis, M., et al., *Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(4): p. 322-34.
341. Roubinet, C., et al., *Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis*. J Cell Biol, 2011. **195**(1): p. 99-112.
342. Echard, A., *Phosphoinositides and cytokinesis: the "PIP" of the iceberg*. Cytoskeleton (Hoboken), 2012. **69**(11): p. 893-912.
343. Schulze, E.S. and S.H. Blose, *Passage of molecules across the intercellular bridge between post-mitotic daughter cells*. Exp Cell Res, 1984. **151**(2): p. 367-73.
344. Gershony, O., et al., *Cytokinetic abscission is an acute G1 event*. Cell Cycle, 2014. **13**(21): p. 3436-41.
345. Crowell, E.F., J.Y. Tinevez, and A. Echard, *A simple model for the fate of the cytokinesis midbody remnant: implications for remnant degradation by autophagy*. Bioessays, 2013. **35**(5): p. 472-81.

346. Lafaurie-Janvore, J., [*Temporal regulation of abscission, the last step of cell division*]. Biol Aujourd'hui, 2013. **207**(2): p. 133-48.
347. Mullins, J.M. and J.J. Biesele, *Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells*. J Cell Biol, 1977. **73**(3): p. 672-84.
348. McIntosh, J.R. and S.C. Landis, *The distribution of spindle microtubules during mitosis in cultured human cells*. J Cell Biol, 1971. **49**(2): p. 468-97.
349. Hu, C.K., M. Coughlin, and T.J. Mitchison, *Midbody assembly and its regulation during cytokinesis*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(6): p. 1024-34.
350. Elad, N., et al., *Microtubule organization in the final stages of cytokinesis as revealed by cryo-electron tomography*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 2): p. 207-15.
351. Piperno, G., M. LeDizet, and X.J. Chang, *Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture*. J Cell Biol, 1987. **104**(2): p. 289-302.
352. Steigemann, P., et al., *Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization*. Cell, 2009. **136**(3): p. 473-84.
353. Guizetti, J., et al., *Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1616-20.
354. Gai, M., et al., *Citron kinase controls abscission through RhoA and anillin*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(20): p. 3768-78.
355. Kechad, A., et al., *Anillin acts as a bifunctional linker coordinating midbody ring biogenesis during cytokinesis*. Curr Biol, 2012. **22**(3): p. 197-203.
356. Zhao, W.M., A. Seki, and G. Fang, *Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(9): p. 3881-96.
357. Carlton, J.G., M. Agromayor, and J. Martin-Serrano, *Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10541-6.
358. Elia, N., et al., *Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 4846-51.
359. Gruneberg, U., et al., *Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2*. J Cell Biol, 2004. **166**(2): p. 167-72.
360. Schonteich, E., et al., *Molecular characterization of Rab11-FIP3 binding to ARF GTPases*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(8): p. 417-31.
361. Kouranti, I., et al., *Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis*. Curr Biol, 2006. **16**(17): p. 1719-25.

362. Echard, A., et al., *Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen*. *Curr Biol*, 2004. **14**(18): p. 1685-93.
363. Somma, M.P., et al., *Molecular dissection of cytokinesis by RNA interference in Drosophila cultured cells*. *Mol Biol Cell*, 2002. **13**(7): p. 2448-60.
364. D'Avino, P.P., *How to scaffold the contractile ring for a safe cytokinesis - lessons from Anillin-related proteins*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 8): p. 1071-9.
365. Piekny, A.J. and A.S. Maddox, *The myriad roles of Anillin during cytokinesis*. *Semin Cell Dev Biol*, 2010. **21**(9): p. 881-91.
366. Joo, E., C.W. Tsang, and W.S. Trimble, *Septins: traffic control at the cytokinesis intersection*. *Traffic*, 2005. **6**(8): p. 626-34.
367. Estey, M.P., et al., *Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission*. *J Cell Biol*, 2010. **191**(4): p. 741-9.
368. Liu, J., et al., *Cleavage furrow organization requires PIP(2)-mediated recruitment of anillin*. *Curr Biol*, 2012. **22**(1): p. 64-9.
369. Madaule, P., et al., *Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis*. *Nature*, 1998. **394**(6692): p. 491-4.
370. Bassi, Z.I., et al., *Sticky/Citron kinase maintains proper RhoA localization at the cleavage site during cytokinesis*. *J Cell Biol*, 2011. **195**(4): p. 595-603.
371. El Amine, N., et al., *Opposing actions of septins and Sticky on Anillin promote the transition from contractile to midbody ring*. *J Cell Biol*, 2013. **203**(3): p. 487-504.
372. Gruneberg, U., et al., *KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis*. *J Cell Biol*, 2006. **172**(3): p. 363-72.
373. Bassi, Z.I., et al., *Citron kinase controls a molecular network required for midbody formation in cytokinesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(24): p. 9782-7.
374. Watanabe, S., et al., *Citron kinase mediates transition from constriction to abscission through its coiled-coil domain*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 8): p. 1773-84.
375. Kurasawa, Y., et al., *Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation*. *EMBO J*, 2004. **23**(16): p. 3237-48.
376. Lekomtsev, S., et al., *Centralspindlin links the mitotic spindle to the plasma membrane during cytokinesis*. *Nature*, 2012. **492**(7428): p. 276-9.
377. Makyio, H., et al., *Structural basis for Arf6-MKLP1 complex formation on the Flemming body responsible for cytokinesis*. *EMBO J*, 2012. **31**(11): p. 2590-603.
378. Lemmon, M.A., *Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides*. *Biochem Soc Symp*, 2007(74): p. 81-93.

379. Schiel, J.A., C. Childs, and R. Prekeris, *Endocytic transport and cytokinesis: from regulation of the cytoskeleton to midbody inheritance*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(7): p. 319-27.
380. McCullough, J., L.A. Colf, and W.I. Sundquist, *Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway*. Annu Rev Biochem, 2013. **82**: p. 663-92.
381. Gaietta, G.M., et al., *Golgi twins in late mitosis revealed by genetically encoded tags for live cell imaging and correlated electron microscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(47): p. 17777-82.
382. Hehnlly, H. and S. Doxsey, *Polarity sets the stage for cytokinesis*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(1): p. 7-11.
383. Gromley, A., et al., *Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission*. Cell, 2005. **123**(1): p. 75-87.
384. Fielding, A.B., et al., *Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis*. EMBO J, 2005. **24**(19): p. 3389-99.
385. Skop, A.R., et al., *Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms*. Science, 2004. **305**(5680): p. 61-6.
386. Murthy, M., et al., *Sec6 mutations and the Drosophila exocyst complex*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 6): p. 1139-50.
387. Low, S.H., et al., *Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells*. Dev Cell, 2003. **4**(5): p. 753-9.
388. Neto, H., G. Balmer, and G. Gould, *Exocyst proteins in cytokinesis: Regulation by Rab11*. Commun Integr Biol, 2013. **6**(6): p. e27635.
389. Wilson, G.M., et al., *The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(2): p. 849-60.
390. Schiel, J.A., et al., *Endocytic membrane fusion and buckling-induced microtubule severing mediate cell abscission*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 9): p. 1411-24.
391. Chesneau, L., et al., *An ARF6/Rab35 GTPase cascade for endocytic recycling and successful cytokinesis*. Curr Biol, 2012. **22**(2): p. 147-53.
392. Dambournet, D., et al., *Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(8): p. 981-8.
393. Schiel, J.A., et al., *FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(10): p. 1068-78.

394. Simon, G.C., et al., *Sequential Cyk-4 binding to ECT2 and FIP3 regulates cleavage furrow ingression and abscission during cytokinesis*. EMBO J, 2008. **27**(13): p. 1791-803.
395. Fremont, S., et al., *Oxidation of F-actin controls the terminal steps of cytokinesis*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14528.
396. Morin, P., C. Flors, and M.F. Olson, *Constitutively active RhoA inhibits proliferation by retarding G(1) to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis*. Eur J Cell Biol, 2009. **88**(9): p. 495-507.
397. Fremont, S., et al., *Emerging roles of MICAL family proteins - from actin oxidation to membrane trafficking during cytokinesis*. J Cell Sci, 2017. **130**(9): p. 1509-1517.
398. Garrus, J.E., et al., *Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding*. Cell, 2001. **107**(1): p. 55-65.
399. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1313-9.
400. VerPlank, L., et al., *Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(14): p. 7724-9.
401. Demirov, D.G., et al., *Overexpression of the N-terminal domain of TSG101 inhibits HIV-1 budding by blocking late domain function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(2): p. 955-60.
402. Carlton, J.G. and J. Martin-Serrano, *Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery*. Science, 2007. **316**(5833): p. 1908-12.
403. Gan, X. and S.J. Gould, *Identification of an inhibitory budding signal that blocks the release of HIV particles and exosome/microvesicle proteins*. Mol Biol Cell, 2011. **22**(6): p. 817-30.
404. Nabhan, J.F., et al., *Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(11): p. 4146-51.
405. Matussek, T., et al., *The ESCRT machinery regulates the secretion and long-range activity of Hedgehog*. Nature, 2014. **516**(7529): p. 99-103.
406. Jimenez, A.J., et al., *ESCRT machinery is required for plasma membrane repair*. Science, 2014. **343**(6174): p. 1247136.
407. Scheffer, L.L., et al., *Mechanism of Ca(2+)-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5646.
408. Olmos, Y., et al., *ESCRT-III controls nuclear envelope reformation*. Nature, 2015. **522**(7555): p. 236-9.

409. Vietri, M., et al., *Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing*. Nature, 2015. **522**(7555): p. 231-5.
410. Zhang, A., et al., *Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 subunit 1 (BLOS1) interacts with sorting nexin 2 and the endosomal sorting complex required for transport-I (ESCRT-I) component TSG101 to mediate the sorting of epidermal growth factor receptor into endosomal compartments*. J Biol Chem, 2014. **289**(42): p. 29180-94.
411. Issman-Zecharya, N. and O. Schuldiner, *The PI3K class III complex promotes axon pruning by downregulating a Ptc-derived signal via endosome-lysosomal degradation*. Dev Cell, 2014. **31**(4): p. 461-73.
412. Loncle, N., et al., *An ESCRT module is required for neuron pruning*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8461.
413. Hurley, J.H., *ESCRTs are everywhere*. EMBO J, 2015. **34**(19): p. 2398-407.
414. Schoneberg, J., et al., *Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(1): p. 5-17.
415. Lange, A., et al., *Evidence for cooperative and domain-specific binding of the signal transducing adaptor molecule 2 (STAM2) to Lys63-linked diubiquitin*. J Biol Chem, 2012. **287**(22): p. 18687-99.
416. Raiborg, C., et al., *Hrs recruits clathrin to early endosomes*. EMBO J, 2001. **20**(17): p. 5008-21.
417. Hofmann, K. and L. Falquet, *A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(6): p. 347-50.
418. Pornillos, O., et al., *HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein*. J Cell Biol, 2003. **162**(3): p. 425-34.
419. Teis, D., et al., *ESCRT-II coordinates the assembly of ESCRT-III filaments for cargo sorting and multivesicular body vesicle formation*. EMBO J, 2010. **29**(5): p. 871-83.
420. Teo, H., D.B. Veprintsev, and R.L. Williams, *Structural insights into endosomal sorting complex required for transport (ESCRT-I) recognition of ubiquitinated proteins*. J Biol Chem, 2004. **279**(27): p. 28689-96.
421. Fyfe, I., et al., *Association of the endosomal sorting complex ESCRT-II with the Vps20 subunit of ESCRT-III generates a curvature-sensitive complex capable of nucleating ESCRT-III filaments*. J Biol Chem, 2011. **286**(39): p. 34262-70.
422. Hanson, P.I., et al., *Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments*. J Cell Biol, 2008. **180**(2): p. 389-402.
423. Pires, R., et al., *A crescent-shaped ALIX dimer targets ESCRT-III CHMP4 filaments*. Structure, 2009. **17**(6): p. 843-56.

424. Lee, C.P., et al., *The ESCRT machinery is recruited by the viral BFRF1 protein to the nucleus-associated membrane for the maturation of Epstein-Barr Virus*. PLoS Pathog, 2012. **8**(9): p. e1002904.
425. Obita, T., et al., *Structural basis for selective recognition of ESCRT-III by the AAA ATPase Vps4*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 735-9.
426. Kieffer, C., et al., *Two distinct modes of ESCRT-III recognition are required for VPS4 functions in lysosomal protein targeting and HIV-1 budding*. Dev Cell, 2008. **15**(1): p. 62-73.
427. Stuchell-Brereton, M.D., et al., *ESCRT-III recognition by VPS4 ATPases*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 740-4.
428. Azmi, I., et al., *Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1*. J Cell Biol, 2006. **172**(5): p. 705-17.
429. Shim, S., S.A. Merrill, and P.I. Hanson, *Novel interactions of ESCRT-III with LIP5 and VPS4 and their implications for ESCRT-III disassembly*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(6): p. 2661-72.
430. Babst, M., et al., *The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 2982-93.
431. Monroe, N. and C.P. Hill, *Meiotic Clade AAA ATPases: Protein Polymer Disassembly Machines*. J Mol Biol, 2016. **428**(9 Pt B): p. 1897-911.
432. Shen, Q.T., et al., *Structural analysis and modeling reveals new mechanisms governing ESCRT-III spiral filament assembly*. J Cell Biol, 2014. **206**(6): p. 763-77.
433. Effantin, G., et al., *ESCRT-III CHMP2A and CHMP3 form variable helical polymers in vitro and act synergistically during HIV-1 budding*. Cell Microbiol, 2013. **15**(2): p. 213-26.
434. Dobro, M.J., et al., *Electron cryotomography of ESCRT assemblies and dividing Sulfolobus cells suggests that spiraling filaments are involved in membrane scission*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(15): p. 2319-27.
435. Chiaruttini, N., et al., *Relaxation of Loaded ESCRT-III Spiral Springs Drives Membrane Deformation*. Cell, 2015. **163**(4): p. 866-79.
436. McCullough, J., et al., *Structure and membrane remodeling activity of ESCRT-III helical polymers*. Science, 2015. **350**(6267): p. 1548-51.
437. Agromayor, M. and J. Martin-Serrano, *Interaction of AMSH with ESCRT-III and deubiquitination of endosomal cargo*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 23083-91.
438. Solomons, J., et al., *Structural basis for ESCRT-III CHMP3 recruitment of AMSH*. Structure, 2011. **19**(8): p. 1149-59.

439. Row, P.E., et al., *The MIT domain of UBPY constitutes a CHMP binding and endosomal localization signal required for efficient epidermal growth factor receptor degradation*. J Biol Chem, 2007. **282**(42): p. 30929-37.
440. Thoresen, S.B., et al., *ANCHR mediates Aurora-B-dependent abscission checkpoint control through retention of VPS4*. Nat Cell Biol, 2014. **16**(6): p. 550-60.
441. Connell, J.W., et al., *Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion*. Traffic, 2009. **10**(1): p. 42-56.
442. Mukai, A., et al., *Dynamic regulation of ubiquitylation and deubiquitylation at the central spindle during cytokinesis*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 8): p. 1325-33.
443. Morita, E., et al., *Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis*. EMBO J, 2007. **26**(19): p. 4215-27.
444. Lee, H.H., et al., *Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55*. Science, 2008. **322**(5901): p. 576-80.
445. Bajorek, M., et al., *Structural basis for ESCRT-III protein autoinhibition*. Nat Struct Mol Biol, 2009. **16**(7): p. 754-62.
446. Carlton, J.G., et al., *ESCRT-III governs the Aurora B-mediated abscission checkpoint through CHMP4C*. Science, 2012. **336**(6078): p. 220-5.
447. Christ, L., et al., *ALIX and ESCRT-I/II function as parallel ESCRT-III recruiters in cytokinetic abscission*. J Cell Biol, 2016. **212**(5): p. 499-513.
448. Goliand, I., et al., *Inhibition of ESCRT-II-CHMP6 interactions impedes cytokinetic abscission and leads to cell death*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(23): p. 3740-8.
449. Mondal, G., et al., *BRCA2 localization to the midbody by filamin A regulates cep55 signaling and completion of cytokinesis*. Dev Cell, 2012. **23**(1): p. 137-52.
450. Lekomtsev, S., et al., *Evidence that the tumor-suppressor protein BRCA2 does not regulate cytokinesis in human cells*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 9): p. 1395-400.
451. Elia, N., et al., *Computational model of cytokinetic abscission driven by ESCRT-III polymerization and remodeling (vol 102, pg 2309, 2012)*. Biophysical Journal, 2012. **103**(1): p. 167-167.
452. Pohl, C. and S. Jentsch, *Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE*. Cell, 2008. **132**(5): p. 832-45.
453. Aoh, Q.L., et al., *SCAMP3 negatively regulates epidermal growth factor receptor degradation and promotes receptor recycling*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(6): p. 1816-32.
454. Sagona, A.P., et al., *PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(4): p. 362-71.
455. Nahse, V., et al., *The Abscission Checkpoint: Making It to the Final Cut*. Trends Cell Biol, 2017. **27**(1): p. 1-11.

456. Norden, C., et al., *The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage*. Cell, 2006. **125**(1): p. 85-98.
457. Mendoza, M., et al., *A mechanism for chromosome segregation sensing by the NoCut checkpoint*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(4): p. 477-83.
458. Capalbo, L., et al., *The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis*. Open Biol, 2012. **2**(5): p. 120070.
459. Caballe, A., et al., *ULK3 regulates cytokinetic abscission by phosphorylating ESCRT-III proteins*. Elife, 2015. **4**: p. e06547.
460. Lafaurie-Janvore, J., et al., *ESCRT-III assembly and cytokinetic abscission are induced by tension release in the intercellular bridge*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1625-9.
461. Mackay, D.R., M. Makise, and K.S. Ullman, *Defects in nuclear pore assembly lead to activation of an Aurora B-mediated abscission checkpoint*. J Cell Biol, 2010. **191**(5): p. 923-31.
462. Mazouzi, A., G. Velimezi, and J.I. Loizou, *DNA replication stress: causes, resolution and disease*. Exp Cell Res, 2014. **329**(1): p. 85-93.
463. Mackay, D.R. and K.S. Ullman, *ATR and a Chk1-Aurora B pathway coordinate postmitotic genome surveillance with cytokinetic abscission*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(12): p. 2217-26.
464. Marzesco, A.M., et al., *Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 13): p. 2849-58.
465. Dubreuil, V., et al., *Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1*. J Cell Biol, 2007. **176**(4): p. 483-95.
466. Ettinger, A.W., et al., *Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 503.
467. Crowell, E.F., et al., *Engulfment of the midbody remnant after cytokinesis in mammalian cells*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 17): p. 3840-51.
468. Pohl, C., *Dual control of cytokinesis by the ubiquitin and autophagy pathways*. Autophagy, 2009. **5**(4): p. 561-2.
469. Kuo, T.C., et al., *Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(10): p. 1214-23.
470. Lotz, K., G. Pyrowolakis, and S. Jentsch, *BRUCE, a giant E2/E3 ubiquitin ligase and inhibitor of apoptosis protein of the trans-Golgi network, is required for normal placenta development and mouse survival*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(21): p. 9339-50.

471. Chahwan, R., et al., *Dma/RNF8 proteins are evolutionarily conserved E3 ubiquitin ligases that target septins*. Cell Cycle, 2013. **12**(6): p. 1000-8.
472. Plans, V., M. Guerra-Rebollo, and T.M. Thomson, *Regulation of mitotic exit by the RNF8 ubiquitin ligase*. Oncogene, 2008. **27**(10): p. 1355-65.
473. Mallette, F.A., et al., *RNF8- and RNF168-dependent degradation of KDM4A/JMJD2A triggers 53BP1 recruitment to DNA damage sites*. EMBO J, 2012. **31**(8): p. 1865-78.
474. Lok, G.T., et al., *Differential regulation of RNF8-mediated Lys48- and Lys63-based poly-ubiquitylation*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(1): p. 196-205.
475. Isakson, P., et al., *TRAF6 mediates ubiquitination of KIF23/MKLP1 and is required for midbody ring degradation by selective autophagy*. Autophagy, 2013. **9**(12): p. 1955-64.
476. Wickstrom, S.A., et al., *CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin*. EMBO J, 2010. **29**(1): p. 131-44.
477. Stegmeier, F., et al., *The tumor suppressor CYLD regulates entry into mitosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 8869-74.
478. Clague, M.J. and S. Urbe, *Endocytosis: the DUB version*. Trends Cell Biol, 2006. **16**(11): p. 551-9.
479. Belaid, A., et al., *Autophagy plays a critical role in the degradation of active RHOA, the control of cell cytokinesis, and genomic stability*. Cancer Res, 2013. **73**(14): p. 4311-22.
480. Belaid, A., et al., *Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again: emerging roles of autophagy in the degradation of signaling proteins*. Autophagy, 2014. **10**(2): p. 201-8.
481. Fabbro, M., et al., *Cdk1/Erk2- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis*. Dev Cell, 2005. **9**(4): p. 477-88.
482. Bastos, R.N. and F.A. Barr, *Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission*. J Cell Biol, 2010. **191**(4): p. 751-60.
483. Frosk, P., et al., *A truncating mutation in CEP55 is the likely cause of MARCH, a novel syndrome affecting neuronal mitosis*. J Med Genet, 2017.
484. Martinez-Garay, I., et al., *The novel centrosomal associated protein CEP55 is present in the spindle midzone and the midbody*. Genomics, 2006. **87**(2): p. 243-53.
485. von Schwedler, U.K., et al., *The protein network of HIV budding*. Cell, 2003. **114**(6): p. 701-13.
486. Kagan, J.C., V.G. Magupalli, and H. Wu, *SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(12): p. 821-6.

487. Scholefield, J., et al., *Super-resolution microscopy reveals a preformed NEMO lattice structure that is collapsed in incontinentia pigmenti*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12629.
488. van der Horst, A. and K.K. Khanna, *The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates cytokinesis through Cep55*. Cancer Res, 2009. **69**(16): p. 6651-9.
489. van der Horst, A., J. Simmons, and K.K. Khanna, *Cep55 stabilization is required for normal execution of cytokinesis*. Cell Cycle, 2009. **8**(22): p. 3742-9.
490. Kamranvar, S.A., et al., *Integrin signaling via FAK-Src controls cytokinetic abscission by decelerating PLK1 degradation and subsequent recruitment of CEP55 at the midbody*. Oncotarget, 2016. **7**(21): p. 30820-30.
491. St-Denis, N., et al., *Myotubularin-related proteins 3 and 4 interact with polo-like kinase 1 and centrosomal protein of 55 kDa to ensure proper abscission*. Mol Cell Proteomics, 2015. **14**(4): p. 946-60.
492. Chang, Y.C., et al., *Characterization of centrosomal proteins Cep55 and pericentrin in intercellular bridges of mouse testes*. J Cell Biochem, 2010. **109**(6): p. 1274-85.
493. Iwamori, T., et al., *TEX14 interacts with CEP55 to block cell abscission*. Mol Cell Biol, 2010. **30**(9): p. 2280-92.
494. Kim, H.J., et al., *Structural and biochemical insights into the role of testis-expressed gene 14 (TEX14) in forming the stable intercellular bridges of germ cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(40): p. 12372-7.
495. Greenbaum, M.P., et al., *TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(13): p. 4982-7.
496. Greenbaum, M.P., L. Ma, and M.M. Matzuk, *Conversion of midbodies into germ cell intercellular bridges*. Dev Biol, 2007. **305**(2): p. 389-96.
497. Greenbaum, M.P., et al., *Mouse TEX14 is required for embryonic germ cell intercellular bridges but not female fertility*. Biol Reprod, 2009. **80**(3): p. 449-57.
498. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1261-74.
499. Hemmings, B.A. and D.F. Restuccia, *PI3K-PKB/Akt pathway*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(9): p. a011189.
500. Cheung, M. and J.R. Testa, *Diverse mechanisms of AKT pathway activation in human malignancy*. Curr Cancer Drug Targets, 2013. **13**(3): p. 234-44.
501. Yang, W.L., et al., *The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation*. Science, 2009. **325**(5944): p. 1134-8.
502. Restuccia, D.F. and B.A. Hemmings, *Cell signaling. Blocking Akt-ivity*. Science, 2009. **325**(5944): p. 1083-4.

503. Fan, C.D., et al., *Ubiquitin-dependent regulation of phospho-AKT dynamics by the ubiquitin E3 ligase, NEDD4-1, in the insulin-like growth factor-1 response*. J Biol Chem, 2013. **288**(3): p. 1674-84.
504. Chen, C.H., et al., *FLJ10540-elicited cell transformation is through the activation of PI3-kinase/AKT pathway*. Oncogene, 2007. **26**(29): p. 4272-83.
505. Chen, C.H., et al., *VEGFA upregulates FLJ10540 and modulates migration and invasion of lung cancer via PI3K/AKT pathway*. PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5052.
506. Hwang, C.F., et al., *Oncogenic fibulin-5 promotes nasopharyngeal carcinoma cell metastasis through the FLJ10540/AKT pathway and correlates with poor prognosis*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84218.
507. Jeffery, J., et al., *Cep55 regulates embryonic growth and development by promoting Akt stability in zebrafish*. FASEB J, 2015. **29**(5): p. 1999-2009.
508. Tsai, C.Y., et al., *Upregulation of FLJ10540, a PI3K-association protein, in rostral ventrolateral medulla impairs brain stem cardiovascular regulation during mevinphos intoxication*. Biochem Pharmacol, 2015. **93**(1): p. 34-41.
509. Jeffery, J., et al., *Beyond cytokinesis: the emerging roles of CEP55 in tumorigenesis*. Oncogene, 2016. **35**(6): p. 683-90.
510. Sakai, M., et al., *Elevated expression of C10orf3 (chromosome 10 open reading frame 3) is involved in the growth of human colon tumor*. Oncogene, 2006. **25**(3): p. 480-6.
511. Colak, D., et al., *Age-specific gene expression signatures for breast tumors and cross-species conserved potential cancer progression markers in young women*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63204.
512. Koch, M. and M. Wiese, *Gene expression signatures of angiocidin and darapladib treatment connect to therapy options in cervical cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(2): p. 259-67.
513. Waseem, A., et al., *Downstream targets of FOXM1: CEP55 and HELLS are cancer progression markers of head and neck squamous cell carcinoma*. Oral Oncology, 2010. **46**(7): p. 536-542.
514. Tao, J., et al., *CEP55 contributes to human gastric carcinoma by regulating cell proliferation*. Tumour Biol, 2014. **35**(5): p. 4389-99.
515. Shiraishi, T., et al., *Cancer/Testis antigens as potential predictors of biochemical recurrence of prostate cancer following radical prostatectomy*. Journal of Translational Medicine, 2011. **9**.
516. Singh, P.K., et al., *Expression and clinical significance of Centrosomal protein 55 (CEP55) in human urinary bladder transitional cell carcinoma*. Immunobiology, 2015. **220**(1): p. 103-8.

517. Zhang, W., et al., *Upregulation of centrosomal protein 55 is associated with unfavorable prognosis and tumor invasion in epithelial ovarian carcinoma*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(5): p. 6239-54.
518. Weinberger, P., et al., *Cell Cycle M-Phase Genes Are Highly Upregulated in Anaplastic Thyroid Carcinoma*. *Thyroid*, 2017. **27**(2): p. 236-252.
519. Montero-Conde, C., et al., *Molecular profiling related to poor prognosis in thyroid carcinoma. Combining gene expression data and biological information*. *Oncogene*, 2008. **27**(11): p. 1554-61.
520. Wang, G., et al., *Centrosomal Protein of 55 Regulates Glucose Metabolism, Proliferation and Apoptosis of Glioma Cells via the Akt/mTOR Signaling Pathway*. *J Cancer*, 2016. **7**(11): p. 1431-40.
521. Chen, C.H., et al., *FLJ10540 is associated with tumor progression in nasopharyngeal carcinomas and contributes to nasopharyngeal cell proliferation, and metastasis via osteopontin/CD44 pathway*. *Journal of Translational Medicine*, 2012. **10**.
522. Hui, L., et al., *Identification of biomarkers with a tumor stage-dependent expression and exploration of the mechanism involved in laryngeal squamous cell carcinoma*. *Oncol Rep*, 2015. **34**(5): p. 2627-35.
523. Jiang, W., Z. Wang, and Y. Jia, *CEP55 overexpression predicts poor prognosis in patients with locally advanced esophageal squamous cell carcinoma*. *Oncol Lett*, 2017. **13**(1): p. 236-242.
524. Fujiwara, T., et al., *Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells*. *Nature*, 2005. **437**(7061): p. 1043-7.
525. Walther, A., R. Houlston, and I. Tomlinson, *Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis*. *Gut*, 2008. **57**(7): p. 941-50.
526. Davoli, T. and T. de Lange, *The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2011. **27**: p. 585-610.
527. Davoli, T. and T. de Lange, *Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells*. *Cancer Cell*, 2012. **21**(6): p. 765-76.
528. Carter, S.L., et al., *A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers*. *Nat Genet*, 2006. **38**(9): p. 1043-8.
529. Zhou, W., et al., *NEK2 induces drug resistance mainly through activation of efflux drug pumps and is associated with poor prognosis in myeloma and other cancers*. *Cancer Cell*, 2013. **23**(1): p. 48-62.
530. Chen, C.H., et al., *Expression of FLJ10540 is correlated with aggressiveness of oral cavity squamous cell carcinoma by stimulating cell migration and invasion through increased FOXM1 and MMP-2 activity*. *Oncogene*, 2009. **28**(30): p. 2723-37.

531. Hirohashi, Y., et al., *Cytotoxic T lymphocytes: Sniping cancer stem cells*. *Oncoimmunology*, 2012. **1**(1): p. 123-125.
532. Gao, X.Y. and X.L. Wang, *An adoptive T cell immunotherapy targeting cancer stem cells in a colon cancer model*. *J BUON*, 2015. **20**(6): p. 1456-63.
533. Goel, H.L. and A.M. Mercurio, *VEGF targets the tumour cell*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(12): p. 871-82.
534. Chang, Y.C., et al., *Centrosomal protein 55 (Cep55) stability is negatively regulated by p53 protein through Polo-like kinase 1 (Plk1)*. *J Biol Chem*, 2012. **287**(6): p. 4376-85.
535. Laoukili, J., M. Stahl, and R.H. Medema, *FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1775**(1): p. 92-102.
536. Myatt, S.S. and E.W. Lam, *The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(11): p. 847-59.
537. Wolter, P., et al., *Central spindle proteins and mitotic kinesins are direct transcriptional targets of MuvB, B-MYB and FOXM1 in breast cancer cell lines and are potential targets for therapy*. *Oncotarget*, 2017. **8**(7): p. 11160-11172.
538. Kato, K., et al., *Matrix metalloproteinases 2 and 9 in oral squamous cell carcinomas: manifestation and localization of their activity*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005. **131**(6): p. 340-6.
539. Lu, Z. and T. Hunter, *Prolyl isomerase Pin1 in cancer*. *Cell Res*, 2014. **24**(9): p. 1033-49.
540. Bondeson, M.L., et al., *A nonsense mutation in CEP55 defines a new locus for a Meckel-like syndrome, an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy*. *Clin Genet*, 2017.
541. Ganem, N.J., Z. Storchova, and D. Pellman, *Tetraploidy, aneuploidy and cancer*. *Curr Opin Genet Dev*, 2007. **17**(2): p. 157-62.
542. Chen, C.T., et al., *Resurrecting remnants: the lives of post-mitotic midbodies*. *Trends Cell Biol*, 2013. **23**(3): p. 118-28.
543. Hubeau, M., et al., *New mechanism of X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency: impairment of ubiquitin binding despite normal folding of NEMO protein*. *Blood*, 2011. **118**(4): p. 926-35.
544. Hu, Q., et al., *Mechanisms of Ubiquitin-Nucleosome Recognition and Regulation of 53BP1 Chromatin Recruitment by RNF168/169 and RAD18*. *Mol Cell*, 2017. **66**(4): p. 473-487 e9.
545. Bondeson, M.L., et al., *A nonsense mutation in CEP55 defines a new locus for a Meckel-like syndrome, an autosomal recessive lethal fetal ciliopathy*. *Clin Genet*, 2017. **92**(5): p. 510-516.

546. Arnold, K., et al., *The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling*. Bioinformatics, 2006. **22**(2): p. 195-201.
547. Laskowski, R.A., et al., *PROCHECK-a program to check the stereochemical quality of protein structures*. Journal of Applied Crystallography, 1993. **26**: p. 283-291.
548. van Gunsteren, W.F., et al., *Biomolecular simulation: the GROMOS manual and user guide*. 1996, ETH Zürich, Switzerland:vdf Hochschulverlag.
549. de Vries, S.J., M. van Dijk, and A.M. Bonvin, *The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking*. Nat Protoc, 2010. **5**(5): p. 883-97.
550. Lobry, C., et al., *Negative feedback loop in T cell activation through IkappaB kinase-induced phosphorylation and degradation of Bcl10*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(3): p. 908-13.
551. de Chaumont, F., et al., *Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 690-6.
552. Wyler, E., et al., *Inhibition of NF-kappaB activation with designed ankyrin-repeat proteins targeting the ubiquitin-binding/oligomerization domain of NEMO*. Protein Sci, 2007. **16**(9): p. 2013-22.
553. Eisinger, J., *Intramolecular energy transfer in adrenocorticotropin*. Biochemistry, 1969. **8**(10): p. 3902-8.
554. Dixon, J.M., M. Taniguchi, and J.S. Lindsey, *PhotochemCAD 2: a refined program with accompanying spectral databases for photochemical calculations*. Photochem Photobiol, 2005. **81**(1): p. 212-3.
555. Fontan, E., et al., *NEMO oligomerization in the dynamic assembly of the IkappaB kinase core complex*. FEBS J, 2007. **274**(10): p. 2540-51.
556. Lu, K.P. and X.Z. Zhou, *The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(11): p. 904-16.
557. Lavoie, S.B., A.L. Albert, and M. Vincent, *[Unexpected roles of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1]*. Med Sci (Paris), 2003. **19**(12): p. 1251-8.
558. Bernabe-Rubio, M., et al., *Novel role for the midbody in primary ciliogenesis by polarized epithelial cells*. J Cell Biol, 2016. **214**(3): p. 259-73.
559. Majumder, P. and O. Chakrabarti, *Mahogunin regulates fusion between amphisomes/MVBs and lysosomes via ubiquitination of TSG101*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1970.
560. Banks, C.A., et al., *TNIP2 is a Hub Protein in the NF-kappaB Network with Both Protein and RNA Mediated Interactions*. Mol Cell Proteomics, 2016. **15**(11): p. 3435-3449.

561. von Muhlinen, N., et al., *LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy*. Mol Cell, 2012. **48**(3): p. 329-42.
562. Wong, Y.C. and E.L. Holzbaur, *Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(42): p. E4439-48.
563. Shembade, N., et al., *The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20*. Nat Immunol, 2008. **9**(3): p. 254-62.
564. Barisic, I., et al., *Meckel-Gruber Syndrome: a population-based study on prevalence, prenatal diagnosis, clinical features, and survival in Europe*. Eur J Hum Genet, 2015. **23**(6): p. 746-52.
565. Nigg, E.A. and J.W. Raff, *Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease*. Cell, 2009. **139**(4): p. 663-78.