



HAL
open science

Conséquences de la perturbation des éléments du cytosquelette dans le déroulement de la phase M et la prolifération cellulaire.

Stéphanie Mirabelle

► **To cite this version:**

Stéphanie Mirabelle. Conséquences de la perturbation des éléments du cytosquelette dans le déroulement de la phase M et la prolifération cellulaire.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00351834

HAL Id: tel-00351834

<https://theses.hal.science/tel-00351834>

Submitted on 11 Jan 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE
Présentée par
Stéphanie Mirabelle

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE 1
(Arrêtés ministériels du 5 juillet 1984 et du 30 mars 1992)
Spécialité Biologie Cellulaire

**Conséquences de la perturbation des éléments du
cytosquelette dans le déroulement de la phase M et la
prolifération cellulaire.**

Soutenue le 31 Octobre 2008 devant le jury composé de :

Michel Robert-Nicoud	Président
Thanos Halazonetis	Rapporteur
Andreas Merdes	Rapporteur
Dimitrios Skoufias	Examineur

Thèse réalisée au sein de l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant et
dirigée par Robert Margolis

Au sein du : Laboratoire des Protéines du Cytosquelette
Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Grenoble

Et du : Sidney Kimmel Cancer Center, San Diego Californie

Remerciements

Je remercie Robert Margolis d'avoir accepté de diriger ma thèse. Je remercie Steven Doxsey de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Je remercie Thanos Halazonetis et Andreas Merdes d'avoir accepté de lire et juger ces travaux de thèse. Je remercie Michel Robert-Nicoud de m'avoir fait l'honneur de diriger ce jury de thèse.

Je remercie particulièrement Dimitrios Skoufias d'avoir accepté de refaire une lecture critique de mon manuscrit de thèse, ainsi que de ses encouragements et de son aide pendant les derniers mois de mon doctorat. J'ai été flatée d'être son élève et touchée de son investissement pour m'aider à aller au bout de mon projet. Je le remercie de l'exigence dont il a fait preuve à mon égard et de la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie mes parents sans qui je n'aurais pas pu mettre en œuvre, continuer et finir ce projet. Je les remercie d'avoir été présents dans les moments difficiles de cette expérience et de m'avoir toujours accordé l'asile matériel ou moral dont j'avais besoin sans me juger.

Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées au cours de mes errances improbables. Je remercie Raphaëlle, Robert, Béatrice, Carla, Akira et Cécile de m'avoir fait le cadeau de leur amitié et d'avoir bravé avec moi les hivers rigoureux et les moustiques intrépides du Massachusetts. Je remercie Gosia, Gaëlle, Steffen, Véronique et Phil pour leur soutien et leur expérience, et aussi leur matériel de camping. Je remercie toutes les personnes que j'ai rencontrées en Californie et qui m'ont fait rire pendant des heures, pour avoir mis de la magie dans ma vie, et avoir contribué à faire de cette expérience un rêve éveillé.

Résumé

Les eucaryotes se divisent selon une série d'étapes régulées finement appelée le cycle cellulaire. Ce cycle cellulaire permet la réplication exacte du génome et sa distribution entre deux cellules filles identiques. Le cycle cellulaire est contrôlé par de nombreux mécanismes qui garantissent l'intégrité du génome. La mitose est la période du cycle cellulaire pendant laquelle le contenu en ADN des cellules est réparti entre les deux cellules filles. Le bon déroulement de la mitose chez les eucaryotes supérieurs est soumis à un point de contrôle dit point de contrôle du fuseau mitotique. L'activité du point de contrôle permet de retarder l'anaphase jusqu'à ce que toutes les conditions requises pour la ségrégation des chromosomes soient présentes. Malgré cela, les cellules peuvent présenter des anomalies de la ségrégation des chromosomes et devenir aneuploïdes. Ceci est fréquemment le cas dans les cellules cancéreuses.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'existence d'une réponse cellulaire survenant dans la phase G1 qui suit une mitose anormale. Nous avons étudié des cellules primaires de mammifères traitées avec de faibles concentrations d'inhibiteurs des microtubules, la vinblastine et le nocodazole. Les cellules ainsi traitées présentent des défauts de ségrégation pendant la mitose et deviennent aneuploïdes. Les cellules résultant de ces mitoses anormales s'arrêtent dans la phase G1 qui suit la division et deviennent sénescents. Nous avons trouvé que les cellules de mammifères transformées par l'antigène grand T de SV40 n'observent pas d'arrêt après une mitose anormale.

Mots clés : cycle cellulaire, mitose, nocodazole, vinblastine, point de contrôle, pRb, p53, aneuploïdie, fuseau mitotique, instabilité chromosomique, REF52, TAG.

Summary

Eukaryotic cells reproduce following a highly regulated sequence of events called the cell cycle. The cell cycle allows an accurate duplication of the genome and its subsequent separation into two identical daughter cells. All along this process, numerous checkpoint mechanisms operate to maintain the genome's integrity. Mitosis is the phase of the cell cycle where the DNA is segregated and splitted into two daughter cells. The spindle assembly checkpoint ensures the fidelity of chromosome segregation. The spindle assembly checkpoint delays the metaphase/anaphase transition until all the conditions for proper chromosomes segregation are set. Despite this control mechanism, cells can missegregate their chromosome and become aneuploid. This is particularly frequent in cancer cells.

In this study, we found that normal cells that undergo abnormal mitosis with chromosome missegregation display a specific post-mitotic arrest and become senescent. When primary mammalian cells were treated with low doses of microtubule poisons, the mitotic spindle was partially disrupted and the rate of chromosome misalignment increased. The cells treated with low concentrations of drugs became aneuploid and arrested in G1 after the abnormal mitosis. The arrest was followed by senescence. We found that cells transformed with SV40 T antigen were unable to arrest after the abnormal mitosis.

Key words : cell cycle, mitosis, nocodazole, vinblastin, checkpoint, pRb, p53, aneuploidy, mitotic spindle, chromosomal instability, REF52, TAG

Table des matières

Table des matières

1	PREAMBULE	3
2	INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	5
2.1	LE CYTOSQUELETTE	5
2.1.1	Introduction	5
2.1.2	Le cytosquelette d'Actine.....	6
2.1.2.1	Rôles	6
2.1.2.2	Structure.....	6
2.1.2.3	Dynamique d'assemblage/désassemblage et régulation.....	7
2.1.2.4	Cas particulier de l'anneau contractile	8
2.1.3	Les microtubules	11
2.1.3.1	Rôles	11
2.1.3.2	Structure.....	12
2.1.3.3	Dynamique d'assemblage	13
2.1.3.4	Cas particulier du fuseau mitotique.....	15
2.1.3.4.1	Mise en place du fuseau	17
2.1.3.4.2	Régulation via les protéines non motrices	18
2.1.3.4.3	Régulation via des protéines motrices	19
2.1.4	Le centrosome.....	24
2.1.4.1	Rôle.....	24
2.1.4.2	Structure.....	25
2.1.4.3	Le cycle de duplication du centrosome.....	26
2.1.4.4	Centrosome et régulation du cycle cellulaire	28
2.2	VIE ET MORT DES CELLULES SOMATIQUES.....	29
2.2.1	Introduction	29
2.2.2	Le cycle cellulaire	29
2.2.2.1	Les différentes phases du cycle cellulaire	31
2.2.2.2	Description de la phase M.....	32
2.2.2.3	Les intervenants moléculaires de la mitose.....	34
2.2.2.3.1	Les complexes régulant la compaction et l'organisation des chromosomes.....	35
2.2.2.3.2	Les kinétochores et les protéines du point de contrôle mitotique	36
2.2.2.3.3	Les protéines passagères.....	39
2.2.2.4	La régulation du cycle cellulaire	42
2.2.2.4.1	Les complexes Cyclines-CDK.....	42
2.2.2.4.2	Les régulateurs des complexes Cyclines-CDK.....	44
2.2.2.5	Cas particulier de la phase G1	44
2.2.2.6	Cas particulier de la mitose	48
2.2.2.6.1	L'entrée en mitose.....	48

2.2.2.6.2	La sortie de mitose	50
2.2.2.7	Les points de contrôle	52
2.2.2.7.1	La notion de point de contrôle du cycle cellulaire	52
2.2.2.7.2	Le point de contrôle de l'antéphase.....	52
2.2.2.7.3	Le point de contrôle du fuseau mitotique.....	52
2.2.2.7.4	Points de contrôle détectant l'endommagement de l'ADN.....	54
2.2.3	<i>La mort cellulaire programmée</i>	56
2.2.4	<i>La senescence</i>	57
2.3	ANOMALIES CHROMOSOMIQUES ET CANCEROGENESE	59
2.3.1	<i>Définitions</i>	59
2.3.2	<i>Origine</i>	60
2.3.3	<i>Rôle dans la cancerogénèse</i>	61
3	OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	63
4	RESULTATS ET DISCUSSION I : ROLE D'UNE PROTEINE DU CENTROSOME DANS LES EVENEMENTS FINAUX DE LA PHASE M	69
4.1	INTRODUCTION AU SUJET	69
4.2	ARTICLE.....	70
5	RESULTATS ET DISCUSSION II : ETUDE DES CONSEQUENCES DE LA PERTURBATION DE LA MITOSE SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE	87
5.1	PRESENTATION DU SUJET.....	87
6	RESULTATS	89
6.1	VALIDATION DU MODELE.....	89
6.1.1	<i>Etude de l'effet de différentes concentrations d'inhibiteurs de la polymérisation des microtubules sur le contenu des cellules en ADN.</i>	90
6.1.2	<i>En présence de faibles doses d'inhibiteur, les cellules traversent la mitose de façon anormale.</i>	93
6.2	ETUDE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES ANEUPLOÏDES.....	101
6.3	CARACTERISATION DU PHENOTYPE OBSERVE.....	105
6.3.1	<i>L'arrêt des cellules est dû aux anomalies de la mitose.</i>	105
6.3.2	<i>Le contournement de cet arrêt nécessite l'inhibition de p53 et de pRb</i>	112
7	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	125
7.1	CONCLUSION	125
7.2	L'IMPORTANCE DES DIFFERENTS STRESS ET POINT DE CONTROLE DANS NOS RESULTATS.....	128
7.3	L'ADAPTATION OU LE « SLIPPAGE » ET LA REPONSE CELLULAIRE.	129
8	MATERIEL	133
8.1	LIGNEES CELLULAIRES UTILISEES	133
8.2	ANTICORPS UTILISES	134

8.2.1	<i>Anticorps primaires</i>	134
8.2.2	<i>Anticorps secondaires</i>	135
8.3	MILIEUX DE CULTURE ET TAMPONS UTILISES	135
8.4	INHIBITEURS UTILISES.....	138
9	METHODES	141
9.1	CULTURE CELLULAIRE.....	141
9.2	TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE	141
9.2.1	<i>Synchronisation des cultures cellulaires</i>	141
9.2.1.1	Enrichissement en cellules en phase G0/G1	141
9.2.1.1.1	La privation de sérum	141
9.2.1.1.2	L'inhibition de contact	142
9.2.1.2	Enrichissement de cellules en phase G1/S.....	142
9.2.1.2.1	L'aphidicoline.....	142
9.2.2	<i>Prolifération cellulaire</i>	142
9.2.2.1	Mesure de la quantité d'ADN des cellules par cytométrie de flux	142
9.2.2.2	Mesure de l'incorporation de BrDU par cytométrie de flux ou par microscopie	144
9.2.2.3	Mesure de marqueurs spécifiques à la mitose par cytométrie de flux	144
9.2.2.3.1	MPM2	144
9.2.2.4	Activité de la β -galactosidase à pH=6	145
9.2.3	<i>Techniques de biochimie : analyse des protéines par western blot</i>	145
9.2.3.1	Lyse des cellules et extraction des protéines totales	145
9.2.3.2	Préparation des échantillons	146
9.2.3.3	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante	146
9.2.3.4	Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose	147
9.2.3.5	Immunodétection des protéines.....	147
9.2.4	<i>Techniques de microscopie</i>	148
9.2.4.1.1	Culture de cellules sur support adapté	148
9.2.4.1.2	Fixations.....	148
9.2.4.1.3	Perméabilisation.....	149
9.2.4.1.4	Immunodétection des protéines	149
9.2.4.1.5	Marquage de l'ADN	149
9.2.4.1.6	Montage sur lame des lamelles.....	150
10	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	153

Index des schémas

Schéma 1: Assemblage d'un filament d'Actine.....	7
Schéma 2 : Mise en place de l'anneau d'Acto-Myosine en mitose.	10
Schéma 3 : Initiation et régulation de la contraction de l'anneau d'Acto-Myosine.....	11
Schéma 4 : Polymérisation des microtubules.....	13
Schéma 5 : Structure du fuseau mitotique.	17
Schéma 6 : Mise en place du fuseau mitotique.....	18
Schéma 7 : Modèle simplifié de l'organisation du fuseau par les moteurs moléculaires.	22
Schéma 8 : Différents types d'attachement des microtubules aux kinétochores.....	24
Schéma 9 : Structure du centrosome	26
Schéma 10 : Cycle de duplication du centrosome.....	27
Schéma 11 : représentation des phases du cycle cellulaire.	30
Schéma 12 : Description de la phase M.....	34
Schéma 13 : Structure du kinétochore.	39
Schéma 14 : Localisation des protéines passagères au cours de la phase M.....	41
Schéma 15 : principaux complexes Cycline-Cdk impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.....	43
Schéma 16 : Régulation de la transition G1/S.	48
Schéma 17 : Régulation de la sortie de mitose par l'APC/C	51

Index des tableaux

Tableau 1 : Principales protéines intervenant dans l'organisation et la régulation des filaments d'Actine.	8
Tableau 2 : Protéines intervenant dans la régulation de la dynamique des microtubules.....	15
Tableau 3 : Principales Cdk impliquées dans le cycle cellulaire et leurs Cyclines associées.	43

Index des figures

Figure 1 : Le nocodazole modifie la répartition de l'ADN dans les REF52.....	91
Figure 2 : La vinblastine et le taxol modifient la répartition de l'ADN dans les REF52	93
Figure 3 : Déroulement d'une mitose normale.	94
Figure 4 : Le nocodazole entraîne différents types de défauts en mitose.	95
Figure 5 : la vinblastine entraîne différents types de défauts en mitose.	96
Figure 6 : Les cellules traversent la mitose avec des anomalies.	97
Figure 7 : Dans les cellules REF52, Bub1 se localise correctement.	98
Figure 8 : La sortie de mitose est retardée en présence d'inhibiteur.	99
Figure 9 : Evaluation de la proportion de cellules aneuploïdes dans la population.....	100
Figure 10 : Les cellules REF52 aneuploïdes et tétraploïdes restent arrêtées en phase G1.....	102
Figure 11 : Les cellules REF52 aneuploïdes et tétraploïdes ne prolifèrent pas.	104
Figure 12 : L'arrêt des cellules en G1 intervient après la mitose anormale.	107
Figure 13 : Les cellules REF52 aneuploïdes et tétraploïdes surexpriment p21Cip1 et p53.....	108
Figure 14 : Les cellules IMR90 aneuploïdes et tétraploïdes deviennent sénescents.	110
Figure 15 : Les cellules REF52 n'ont pas de dommages à l'ADN.....	111
Figure 16 : p38MAPK est activée dans les extraits de cellules aneuploïdes et tétraploïdes.....	113
Figure 17 : p38MAPK est activée en sortie de mitose anormale.	114
Figure 18 : L'inhibition de p38MAPK est insuffisante pour contourner l'arrêt en G1.....	116
Figure 19 : Les cellules REF52-p53DD aneuploïdes restent arrêtées en phase G1 tandis que les REF52-p53DD tétraploïdes progressent en phase S.	117
Figure 20 : L'antigène grand T de SV40 permet de contourner l'arrêt des cellules aneuploïdes.	119
Figure 21 : Les cellules REF52 aneuploïdes surexpriment p21Cip1 et p27Kip1.	120
Figure 22 : Comparaison entre les cellules aneuploïdes et tétraploïdes REF52 et TAG.....	121

Abreviations

Actine-f	Actine filamentaire
Actine-g	Actine globulaire
ADN	Acide desoxyribonucleique
ADP/ATP	Adenosine di- ou tri- phosphate
APC/C	Complexe promoteur de l'anaphase
BrdU	Bromodeoxyuridine triphosphate
BSA	Albumine serique bovine
Cy3	Cyanine 3
DCB	Dihydrocytochalasine B
DMEM	Milieur de Eagle modifie par Dulbecco
DMSO	Dimethylsulfoxyde
DTT	Dithitritol
EDTA	Acide ethylene diamine tetraacetique
EGTA	Acide ethylene glycol-bis(beta-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraacetique
FITC	Isothiocyanate de fluoresceine
GPD/GTP	Guanosine di- ou tri-phosphate
GTPase	GTP hydrolase
HRP	Peroxydase de raifort
HEPES	Acide N-2-hydroethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonique
kDa	Kilo Dalton
MAP	Protéine associée aux microtubules
MTOC	Centre organisateur des microtubules
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCM	Matériel pericentriolaire
PI	Iodure de propidium
pRb	Protéine du rétinoblastome
qsp	Quantité suffisante pour
REF	Fibroblastes embryonnaires de rat
SDS	Dodecylsulfate de sodium
SV40	Virus Simien 40
TAG	Cellules REF52 transformées par l'antigène T de SV40
TEMED	N,N,N',N4 tétraméthylène diamine
TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

Introduction

1 Préambule

La théorie cellulaire, selon laquelle tous les êtres vivants sont constitués de cellules, des compartiments microscopiques délimités par une membrane, date des années 1830. Cette révolution a conduit à de nombreuses découvertes et notamment celle de la division cellulaire, le mode de prolifération des eucaryotes supérieurs. La théorie cellulaire a aussi permis d'envisager les pathologies humaines comme étant la cause de dysfonctionnements cellulaires, voire moléculaires.

A la fin du XIX^{ième} siècle, Théodore Boveri avait prédit d'après ses seules observations de cellules en division, que les anomalies de la mitose pouvaient conduire à l'instabilité chromosomique et au cancer. Il avait émis l'hypothèse que le centrosome est responsable de la ségrégation des chromosomes et qu'un nombre anormal de centrosomes entraîne l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique. Cette hypothèse est toujours d'actualité. L'intérêt des chercheurs, à la fois pour le centrosome et pour les mécanismes qui conduisent à l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique, est d'autant plus grand que l'association entre les anomalies de la division cellulaire et le cancer est désormais un fait établi. Si les efforts de la recherche ont permis de répondre à un grand nombre de questions, le rôle exact du centrosome en mitose et le rôle de l'aneuploïdie dans le processus de cancérogenèse restent mal définis.

L'étude du déroulement et de la régulation du cycle cellulaire est non seulement passionnante et fascinante, mais elle est aussi à l'origine de nouvelles thérapeutiques. Ce sont les connaissances en biologie cellulaire et moléculaire acquises qui nourrissent aujourd'hui le développement par de grands groupes pharmaceutiques de nouveaux inhibiteurs destinés à traiter les patients atteints de cancer.

2 Introduction bibliographique

Dans cette introduction bibliographique, je présente dans une première partie le cytosquelette et son rôle dans la division cellulaire. Dans une seconde partie, j'aborde la régulation de la prolifération cellulaire, avec une introduction au cycle cellulaire ainsi qu'aux mécanismes de l'apoptose et de la sénescence. Enfin, je me suis attachée à présenter l'état des connaissances sur l'aneuploïdie et l'instabilité chromosomique.

2.1 Le cytosquelette

2.1.1 Introduction

Dans les cellules eucaryotes, le cytosquelette est composé de trois familles de filaments, chaque type de filament est construit à partir de protéines différentes (Alberts 2002). Les protéines qui constituent les filaments sont parmi les plus abondantes dans les cellules eucaryotes. On décrit les filaments d'Actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ces trois familles de filaments, bien qu'elles interagissent dans certains mécanismes, sont régulées différemment et ont des fonctions complémentaires. Elles partagent la propriété d'être des polymères dont l'assemblage et le désassemblage se produisent très rapidement, et la dynamique très importante de ces structures ainsi que leur capacité de se réorganiser constamment est nécessaire à leurs fonctions.

Je décris brièvement dans ce chapitre le fonctionnement du cytosquelette d'Actine relatif à la division cellulaire, puis, de façon plus approfondie, le fonctionnement et la régulation du cytosquelette de microtubules qui est indispensable à la division cellulaire, et enfin le centrosome.

2.1.2 Le cytosquelette d'Actine

2.1.2.1 Rôles

Le cytosquelette d'Actine intervient dans l'interaction entre la cellule et son environnement en régulant la forme de la cellule, son adhérence à la matrice extracellulaire et les phénomènes de migration (Vicente-Manzanares, Webb et al. 2005). L'Actine est un des composants majeurs des myofibrilles qui constituent les fibres musculaires et permet en s'organisant avec des molécules de Myosine II de former des fibres capables de se contracter, et donc de modifier la forme et la taille des cellules (Bagshaw 2000). Les filaments d'Actine jouent aussi un rôle dans le métabolisme cellulaire, notamment dans le transport actif de vésicules qui est nécessaire aux mécanismes de sécrétion, d'endocytose et dans la synthèse de lipides (Lanzetti 2007). Enfin, les filaments d'Actine jouent un rôle déterminant dans la dernière phase de la division cellulaire, la cytokinèse, en formant un anneau contractile responsable de la séparation des deux cellules filles (Wang 2001; Burgess 2005).

2.1.2.2 Structure

Les microfilaments d'Actine, ou Actine-f pour Actine-fibrillaire, sont formés à partir d'une seule molécule, l'Actine-g ou Actine globulaire, c'est-à-dire l'Actine sous sa forme monomérique. L'Actine-g est une protéine de 43 kDa dont il existe plusieurs isoformes. On dénombre 6 isoformes de l'Actine-g chez les mammifères qui sont codés par des gènes différents, régulés de façon tissu-spécifique (Vandekerckhove and Weber 1978). Les molécules d'Actine-g sont couplées à une molécule d'ATP qui est hydrolysée en ADP lors du processus de polymérisation. La polymérisation des microfilaments d'Actine s'effectue à partir de sous-unités formées de trimères d'Actine-g qui permettent d'amorcer la formation d'un noyau (Alberts 2002). Du fait même de la présence de la molécule d'ATP, les microfilaments d'Actine formés sont dit polaires, avec deux extrémités structurellement différentes. On distingue l'extrémité (+) ou « barbue » et

l'extrémité (-) ou « pointue ». Ces deux extrémités présentent des cinétiques d'assemblage et de désassemblage des monomères d'Actine différentes, l'extrémité (+) incorporant plus rapidement des sous-unités d'Actine que l'extrémité (-) (cf. schéma 1). La différence de vitesse d'assemblage et de désassemblage des sous-unités aux deux extrémités induit une polymérisation globalement « en tapis roulant » (« *treadmilling* »), avec un flux unidirectionnel des nouvelles sous-unités vers le pôle (-) (Wang 1985).

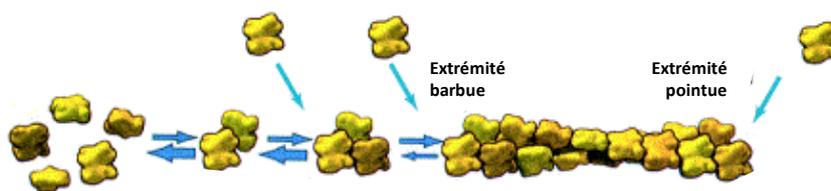


Schéma 1: Assemblage d'un filament d'Actine

Les monomères d'Actine se combinent pour former un trimère. Le filament d'Actine s'allonge par addition d'Actine-g aux deux extrémités qui ont des cinétiques de polymérisation différentes. Globalement, l'élongation du filament d'actine s'opère par *treadmilling*, avec une extrémité (+) dite barbue plus rapide et l'extrémité (-) dite pointue moins rapide. D'après (Amann and Pollard 2000).

2.1.2.3 Dynamique d'assemblage/désassemblage et régulation

In vitro, la polymérisation des filaments d'Actine se produit lorsque l'Actine-g atteint une certaine concentration, et la vitesse de polymérisation dépend aussi de la concentration d'Actine-g. *In vivo*, la nucléation et la dynamique d'élongation des filaments sont régulées par des protéines interagissant soit avec les monomères d'actine soit avec les filaments d'actine (Welch, Mallavarapu et al. 1997; dos Remedios, Chhabra et al. 2003). Une liste non exhaustive de ces protéines régulatrices et de leur mode d'action est présentée dans le tableau 1.

La régulation de la contraction des myofibrilles dans les fibres musculaires dépend essentiellement de la régulation de la Myosine II. La Myosine II est une protéine motrice

interagissant avec les filaments d'Actine et capable de transformer l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique.

Famille et protéines	Rôles et principales caractéristiques	Référence
Profiline	Se fixe à l'Actine-g, favorise l'échange ADP-ATP sur l'Actine-g, régulée par les phosphoinositides	a, b, c
β4-Thymosine	Se fixe à l'Actine-g et empêche la polymérisation spontanée d'Actine-f	a, c
Complexe Arp2/3	Se fixe latéralement sur l'Actine-f et stimule la nucléation d'Actine-f, régulé par les GTPases Rac et Cdc42	b, d
Protéines de coiffe de l'Actine-f	Se fixent sur les extrémités barbues de l'Actine-f, bloquant la polymérisation, régulées par les phosphoinositides	a, b
Gelsoline, Villine	Coupent les filaments d'Actine et se fixent ensuite sur les extrémités barbues, régulées par les phosphoinositides et les ions Ca^{2+}	a, b
ADF/Cofiline	Fixe l'Actine-g/ADP et l'Actine-f/ADP, accélère le treadmilling en favorisant la dépolymérisation des sous-unités d'Actine de l'extrémité pointue, régulées par les phosphoinositides et par phosphorylation	a, b, e
Filamine, Fimbrine, α-Actinine, Fascine	Se fixent latéralement aux filaments d'Actine et les relient entre eux pour les assembler en paquet, régulées par les phosphoinositides	a, b
ERM (Ezrine, Radixine, Moésine)	Fixent les extrémités barbues et interagissent avec des protéines membranaires, permettent l'ancrage des filaments d'Actine à la membrane plasmique, régulées par les phosphoinositides et par phosphorylation	F

Tableau 1 : Principales protéines intervenant dans l'organisation et la régulation des filaments d'Actine.

Références : a :(Stossel, Chaponnier et al. 1985), b :(Schmidt and Hall 1998), c :(Sun, Kwiatkowska et al. 1995), d :(Welch 1999), e :(Carlier 1998), f :(Louvet-Vallee 2000).

2.1.2.4 Cas particulier de l'anneau contractile

En cytokinèse, l'Actine forme avec la Myosine II un anneau contractile juste sous la membrane cellulaire, à mi-distance entre les deux centrosomes (Burgess 2005). A la fin de la

division cellulaire cet anneau se contracte tel un sphincter et départage les deux cellules filles tout en délimitant le site du clivage qui aura lieu en toute fin de cytokinèse. Les protéines Formine et Profiline participent à la polymérisation des fibres d'Acto-Myosine (Basu and Chang 2007).

La mise en place de cet anneau contractile est guidée par la protéine Anilline, qui se lie d'une part à la membrane et d'autre part aux filaments d'Actine (Piekny and Glotzer 2008) (voir schéma 2). La contraction de l'anneau contractile est principalement contrôlée par la protéine RhoA, une protéine GTPase qui est l'isotype principal des protéines Rho chez les mammifères (Hickson and O'Farrell 2008). Parmi les inducteurs de l'activation de RhoA lors de la cytokinèse seraient les microtubules astraux (D'Avino, Savoian et al. 2005). L'extrémité (+) des microtubules astraux qui est dirigée vers la membrane (le cortex) serait à l'origine de signaux qui inhiberaient la contraction et limiteraient ainsi l'ingression de la membrane à la zone située autour de l'anneau contractile, non régulée par les microtubules astraux (cf. schéma 2) (Basu and Chang 2007).

Par ailleurs, l'accumulation, au niveau du fuseau central (*central spindle*), de protéines nécessaires à l'accumulation et l'activation locale de RhoA limiterait aussi la localisation de l'anneau contractile. Parmi les protéines régulatrices de RhoA au fuseau central se trouve Ect2/Pebble (une GEF : *GTP-GDP Exchange Factor*) et MgcRacGAP (une GAP : *GTPase Activating Protein*), dont la localisation est restreinte au fuseau central par liaison à la protéine motrice de type kinésine MKLP1 (Kurasawa, Earnshaw et al. 2004; McCollum 2004; Zhu, Bossy-Wetzels et al. 2005). Ect2/Pebble est aussi phosphorylée en métaphase et cette phosphorylation inhibe sa liaison à MKLP1 (Piekny, Werner et al. 2005). Les protéines kinases Aurora B et Plk1 jouent aussi un rôle dans la régulation de la cytokinèse. La protéine kinase Aurora B phosphoryle MgcRacGAP et cette phosphorylation modifie l'activité RacGAP en activité RhoGAP, qui permet l'activation de RhoA et la contraction de l'anneau (Minoshima, Kawashima et al. 2003). La protéine kinase Plk1 régule quant à elle la localisation sur le fuseau central d'Ect2/Pebble (Petronczki, Glotzer et al. 2007). En l'absence d'activité Plk1 spécifiquement en cytokinèse, l'ingression de la membrane ne se produit pas.

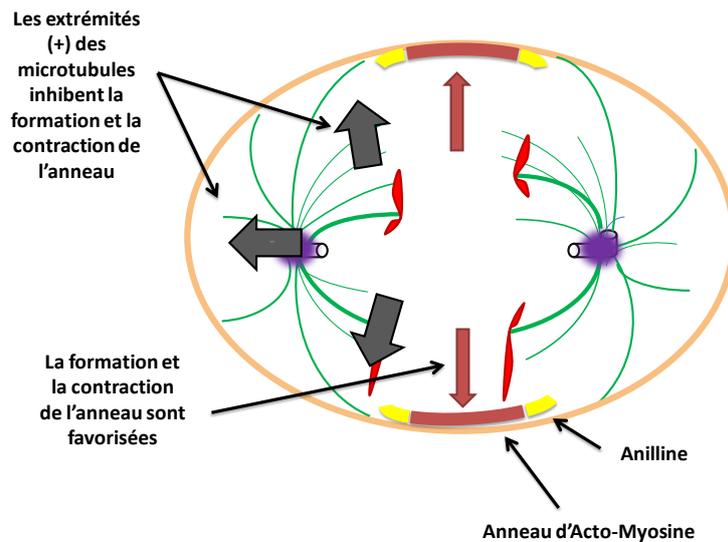


Schéma 2 : Mise en place de l'anneau d'Acto-Myosine en mitose.

A partir de l'anaphase, la cellule met en place l'anneau d'Acto-Myosine. L'Anilline forme un double anneau lié à la membrane. Les filaments d'Acto-Myosine se polymérisent dans l'espace déterminé par l'Anilline. Les extrémités (+) des microtubules ont un effet inhibiteur sur la polymérisation et la contraction de l'anneau d'Acto-Myosine qui va s'établir dans l'espace de la membrane plasmique non régulé par les microtubules.

La Myosine II est responsable de la contraction de l'anneau d'Acto-Myosine en télophase et en cytokinèse. Elle est régulée par phosphorylation sur les résidus Ser19/Thr18 de sa chaîne légère. En fin de phase G2, la chaîne légère de la Myosine II est phosphorylée et la Myosine II est active, jouant un rôle au niveau des adhésions focales et des fibres de stress. En début de prophase, la phosphatase spécifique de la Myosine est activée, elle déphosphoryle la Myosine II, ce qui permet la réorganisation du réseau de microfilaments d'Actine (Matsumura, Totsukawa et al. 2001). En fin de mitose, lors de la cytokinèse, la Myosine II est phosphorylée et activée par des kinases dépendantes de Rho (Matsumura, Totsukawa et al. 2001). Les kinases Citron et ROCK sont des effecteurs de Rho et sont capables de phosphoryler la chaîne légère de la Myosine II *in vitro* (Piekny, Werner et al. 2005). Citron et ROCK ont été impliquées dans la régulation de la contraction de l'anneau d'Acto-Myosine (Madaule, Eda et al. 1998; Matsumura, Totsukawa et al. 2001; Yamashiro, Totsukawa et al. 2003). Une description de ce mécanisme est présentée dans le schéma 3.

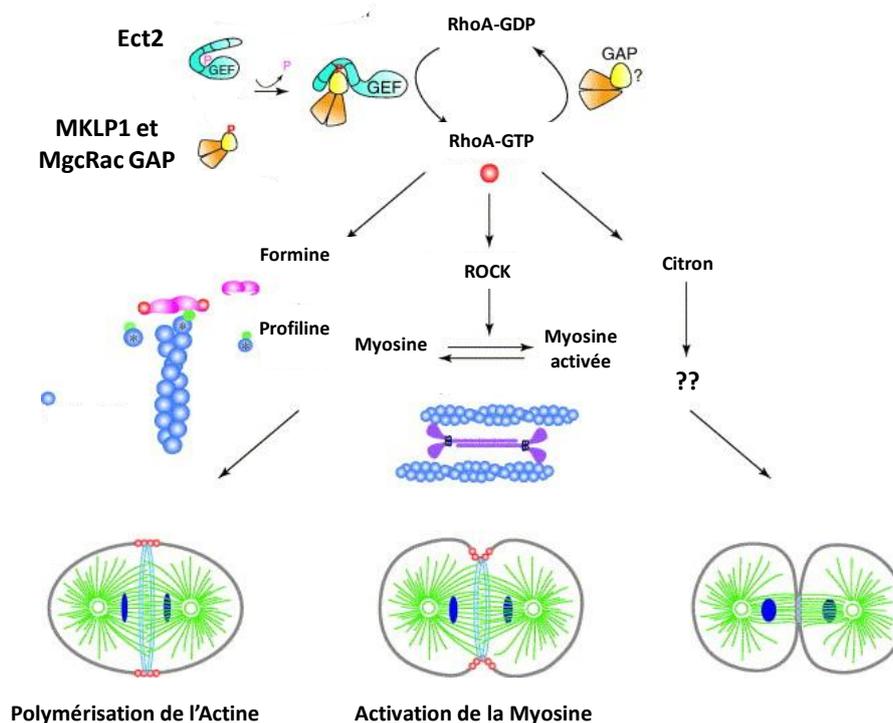


Schéma 3 : Initiation et régulation de la contraction de l'anneau d'Acto-Myosine

La polymérisation de l'Actine au niveau de l'anneau d'Acto-Myosine est régulée par la Formine et la Profiline. L'activation de RhoA nécessite à la fois MKLP1 et Ect2 et MgcRacGAP phosphorylé par Aurora B. La déphosphorylation d'Ect2 est nécessaire à sa liaison à MKLP1. L'activation de RhoA entraîne l'activation de plusieurs effecteurs. ROCK phosphoryle la chaîne légère de la Myosine et permet la contraction, Citron est importante dans les événements plus tardifs de la télophase. D'après (Taylor and McKeon 1997;

2.1.3 Les microtubules

2.1.3.1 Rôles

Les microtubules interviennent dans l'organisation du cytoplasme, ils sont responsables de la place centrale du noyau cellulaire et régulent la répartition et localisation de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Les microtubules jouent un rôle très important dans la structure des axones neuronaux. Le cytosquelette microtubulaire est particulièrement impliqué dans le transport de molécules spécifiques via des moteurs moléculaires qui se déplacent sur les microtubules. Ce transport est particulièrement important dans le fonctionnement des neurones

mais aussi pour les échanges entre le noyau et le cytoplasme. Les microtubules forment aussi la structure des cils que l'on peut observer dans certaines cellules somatiques et qui constituent le flagelle du spermatozoïde.

Les microtubules opèrent un complet réarrangement de leur organisation pour former le fuseau mitotique en début de mitose puis le fuseau central en télophase. La dynamique des microtubules est déterminante pour le bon déroulement de la mitose et la ségrégation correcte des chromosomes. Le point de contrôle mitotique permet de contrôler la dynamique des microtubules grâce à des mécanismes que je décris plus loin. Récemment, il a été montré que la phase G2 serait aussi le lieu d'un contrôle de la dynamique des microtubules via la protéine Chfr, cette découverte est aussi décrite dans le chapitre consacré aux points de contrôles du cycle cellulaire.

2.1.3.2 Structure

Les microtubules sont des polymères composés de proto-filaments de Tubuline, un dimère comprenant une sous-unité de Tubuline- α et une de Tubuline- β (Alberts 2002). Chacune des sous-unités du dimère est associée à une molécule de GTP. Au cours de la polymérisation des microtubules la molécule de GTP associée à la sous-unité β est hydrolysée en GDP, tandis que la molécule de GTP associée à la sous-unité α est non hydrolysable (David-Pfeuty, Erickson et al. 1977; Spiegelman, Penningroth et al. 1977). Les microtubules sont des tubes creux de 24 nm de diamètre formés de 13 proto-filaments de Tubuline associés latéralement et orientés dans la même direction (cf. schéma 4). La structure résultante est polarisée, avec une extrémité présentant des sous-unités α et une extrémité présentant des sous-unités β (Alberts 2002). Ces deux extrémités ont des dynamiques d'assemblage et de désassemblage différentes. On décrit les extrémités des microtubules selon leur dynamique, ainsi l'extrémité qui polymérise/dépolymérise le plus rapidement est l'extrémité (+), l'autre est l'extrémité (-). Des études de biologie structurale ont permis de déterminer que l'extrémité (+) est en fait celle présentant les sous-unités β (Downing and Nogales 1999).

In vivo, l'élongation des microtubules se fait à partir de « noyaux », les γ -TuRC (pour *Tubulin Ring Complexes*) situés au niveau des MTOC (pour *Microtubules Organising Center*) (Raynaud-Messina and Merdes 2007). Ces noyaux, visibles en microscopie électronique, sont des structures en forme d'anneau dont le diamètre est similaire à celui des microtubules. Ces noyaux contiennent une Tubuline particulière, la Tubuline- γ , dont dépend la nucléation des microtubules. Chez les mammifères supérieurs les MTOC correspondent aux centrosomes.

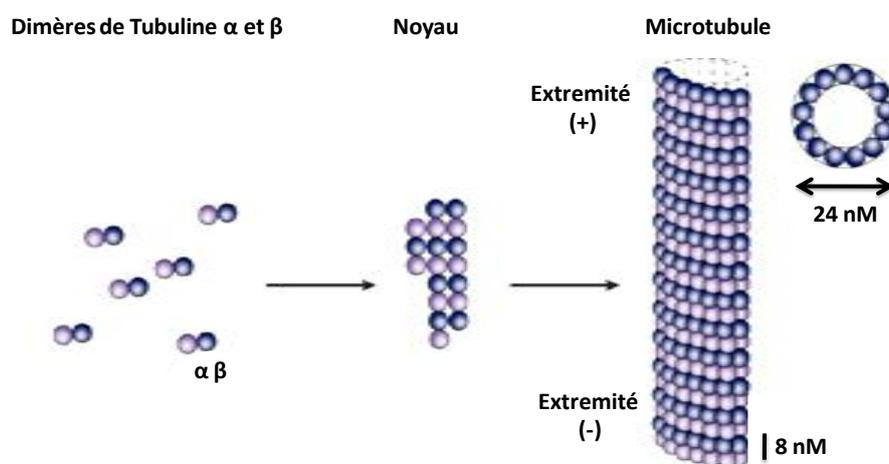


Schéma 4 : Polymérisation des microtubules.

Les dimères de Tubulines s'arrangent de façon à former un polymère qui servira de noyau nécessaire à l'élongation des microtubules. Les dimères de 8 nm de longueur s'assemblent de façon polarisée et forment des microtubules présentant deux extrémités différentes, une extrémité (+) et une extrémité (-). La structure résultante est un tube creux de 24 nM de diamètre. D'après (Taylor and McKeon 1997; Jordan and Wilson

2.1.3.3 Dynamique d'assemblage

Les microtubules s'assemblent et se désassemblent selon une combinaison de deux phénomènes : le *treadmilling* ou tapis roulant, et l'instabilité dynamique (Margolis and Wilson 1978; Mitchison and Kirschner 1984).

Le modèle du *treadmilling* postule que la différence de dynamique d'assemblage et de désassemblage aux deux extrémités apparaît comme un flux directionnel de Tubuline à travers le

polymère, de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-). Globalement la perte de sous unités de l'extrémité (-) est compensée par le gain de sous-unités à l'extrémité (+), selon un état stationnaire.

Le modèle de l'instabilité dynamique permet d'expliquer les variations très rapides de la taille des microtubules. Ce modèle implique l'alternance de phases de polymérisations rapides (sauvetage) et de dépolymérisations rapides (catastrophes) à chaque extrémité qui se traduisent globalement par la croissance ou bien la décroissance des microtubules.

Les deux modèles ont été validés à la fois *in vivo* et *in vitro* et semblent être complémentaires, bien que le modèle de l'instabilité dynamique soit prédominant. La dynamique de polymérisation des microtubules *in vivo* implique des vitesses de polymérisation supérieures à celles observées *in vitro* et des alternances entre croissance et décroissance aux extrémités plus fréquentes (Desai and Mitchison 1997). Ces différences sont dues à la présence dans la cellule de protéines régulant la nucléation et la dynamique des microtubules ainsi que de signaux internes et externes modifiants à la fois la dynamique et l'organisation du cytosquelette de microtubules. Les protéines qui agissent sur la dynamique des microtubules sont régulées via leur disponibilité au cours du cycle, leur localisation, et pour certaines, leur état de phosphorylation (Cassimeris 1999). Une liste non exhaustive de ces protéines et de leur mode d'action est présentée dans le tableau 2.

Famille et protéines	Rôle, principales caractéristiques	Référence
MAP1, MAP2, MAP3	Protéines neuronales, se lient latéralement aux microtubules et les stabilisent	a, b
Tau	Protéine neuronale, stabilise les microtubules dans les axones	a, b
STOP (Stable Tubule Only Polypeptide)	Effecteur de la stabilité des microtubules neuronaux	c
MAP4	Protéine ubiquitaire, se lie latéralement aux microtubules et les stabilise, son affinité pour les microtubules est réduite par phosphorylation	a, b
OP18/Stathmine	Protéine ubiquitaire, se lie aux dimères de Tubuline, déstabilise les microtubules en augmentant la fréquence des catastrophes, son activité est inhibée par phosphorylation	d,e
Katanine	Coupe les microtubules, localisation centrosomale	f, g
EB1, EB3 (End Binding)	Se lie à l'extrémité (+) des microtubules ainsi qu'aux kinétochores, stabilise les microtubules et diminue les catastrophes.	h, i
CLIP115, CLIP170	Se lie à l'extrémité (+) des microtubules, stabilise les microtubules et diminue les catastrophes.	h, i
CLASP1, 2	Se lie à l'extrémité (+) des microtubules, stabilise les microtubules à proximité de la membrane plasmique, leurs affinités pour les microtubules sont diminuées par phosphorylation.	h, i
APC	Se lie à l'extrémité (+) des microtubules, stabilise les microtubules à proximité de la membrane plasmique, son affinité pour les microtubules est diminuée par phosphorylation.	h, i

Tableau 2 : Protéines intervenant dans la régulation de la dynamique des microtubules.

Références : a : (Olmsted 1986), b : (Mandelkow and Mandelkow 1995), c : (Bosc, Cronk et al. 1996), d : (Belmont, Mitchison et al. 1996), e : (Marklund, Larsson et al. 1996), f : (McNally 1996), g : (McNally, Okawa et al. 1996), h : (Akhmanova and Steinmetz 2008), i : (Jaworski, Hoogenraad et al. 2008)

2.1.3.4 Cas particulier du fuseau mitotique

Dans les cellules eucaryotes, le réseau de microtubules interphasique, constitué majoritairement de microtubules longs et relativement stables, est complètement dépolymérisé puis réorganisé lors de la mitose. En prophase, le fuseau mitotique se met en place progressivement. Cette structure bipolaire, dont les pôles se forment autour des centrosomes, est faite de différents types de microtubules très dynamiques et courts. Le fuseau mitotique

s'établit entre les centrosomes et les chromosomes et dépend fortement de ces deux éléments. Les microtubules du fuseau interagissent avec les bras des chromosomes ainsi qu'avec les kinétochores. Les kinétochores sont des structures protéiques qui s'assemblent lors de la mitose au niveau des centromères et forment une plateforme sur laquelle les microtubules viennent s'attacher. Je les décris plus loin, dans le chapitre consacré à la mitose.

On distingue au moins quatre sous-groupes de microtubules différents dans le fuseau mitotique. Les microtubules astraux sont courts et irradient à partir du centrosome vers le cortex, les extrémités (-) au niveau du centrosome et les extrémités (+) vers le cortex. Ces microtubules n'interagissent pas avec les chromosomes mais jouent un rôle dans le positionnement du fuseau mitotique et la régulation de l'anneau contractile. Les microtubules interpolaires émanent aussi des pôles et sont dirigés vers le centre de la cellule. Ils ont pour fonction de stabiliser le fuseau bipolaire. Les fibres kinétochoriennes sont des paquets de microtubules émanant des pôles et orientés de façon identique, l'extrémité (+) dirigée vers les kinétochores. Ces fibres s'attachent à la partie externe des kinétochores et sont responsables de la congression et de la ségrégation des chromosomes. Enfin, des microtubules, émanant des pôles et interagissant avec les bras des chromosomes, permettent la stabilité des chromosomes. Une représentation simplifiée du fuseau mitotique est présentée dans le schéma 5.

La mise en place et la régulation du fuseau mitotique fait intervenir un grand nombre de protéines modulant la dynamique, la nucléation ou bien l'organisation des microtubules, parmi lesquelles on trouve des protéines motrices et des protéines non motrices (Wittmann, Hyman et al. 2001; Kline-Smith and Walczak 2004; Manning and Compton 2008).

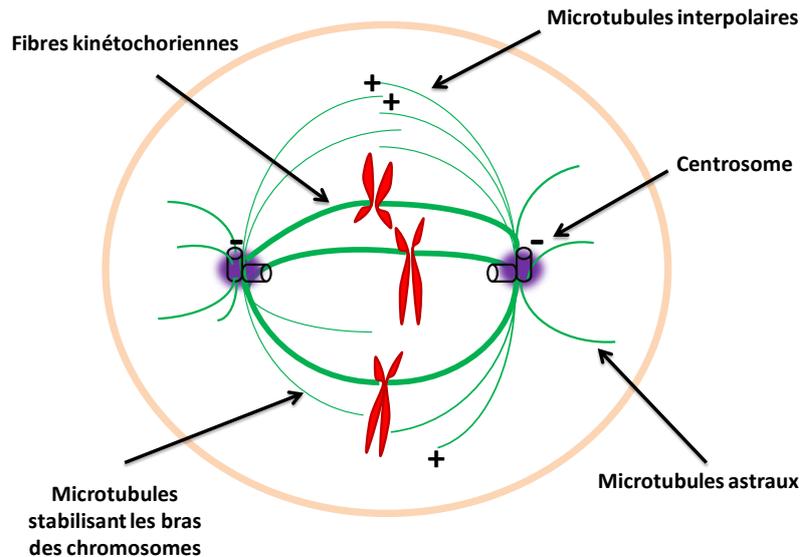


Schéma 5 : Structure du fuseau mitotique.

Le fuseau mitotique contient différentes sous-populations de microtubules. Le centrosome regroupe les extrémités (-) des microtubules. Les microtubules stabilisant les chromosomes interagissent avec les chromatides. Les fibres kinétochoriennes se lient aux kinétochores, au niveau du centromère. Les microtubules interpolaire interagissent entre eux et permettent de stabiliser le fuseau. Les microtubules astraux sont relativement courts en métaphase et interagissent avec la membrane plasmique pour positionner le fuseau.

2.1.3.4.1 Mise en place du fuseau

Le fuseau mitotique s'élabore entre les centrosomes et les chromosomes. Plusieurs mécanismes collaborent à sa mise en place (cf. schéma 6) (O'Connell and Khodjakov 2007). Le premier mécanisme, explique la mise en place du fuseau selon un modèle dit de « *Search and Capture* » (Kirschner and Mitchison 1986). Selon ce modèle, les microtubules nucléés à partir des centrosomes polymérisent d'après le modèle de l'instabilité dynamique, avec une succession de catastrophes et de sauvetages. Ces microtubules sont polymérisés dans le cytoplasme de façon aléatoire, et se stabilisent au contact des kinétochores, jusqu'à ce que tous les kinétochores soient occupés par des microtubules.

Un autre mécanisme de mise en place du fuseau a été découvert plus tard. Il repose sur l'existence d'un gradient qui permet de favoriser la nucléation des microtubules à proximité des

chromosomes. Ce gradient diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la chromatine. Il est constitué de la protéine RanGTP qui a la propriété de nucléer les microtubules et sa mise en place dans la cellule nécessite l'activité de la protéine RCC1 (Carazo-Salas, Gruss et al. 2001; Gruss, Carazo-Salas et al. 2001). Le gradient agirait de deux façons, d'une part en stimulant directement la nucléation des microtubules (Karsenti and Vernos 2001), d'autre part en concentrant les facteurs permettant la stabilisation des microtubules issus du centrosome (Bastiaens, Caudron et al. 2006).

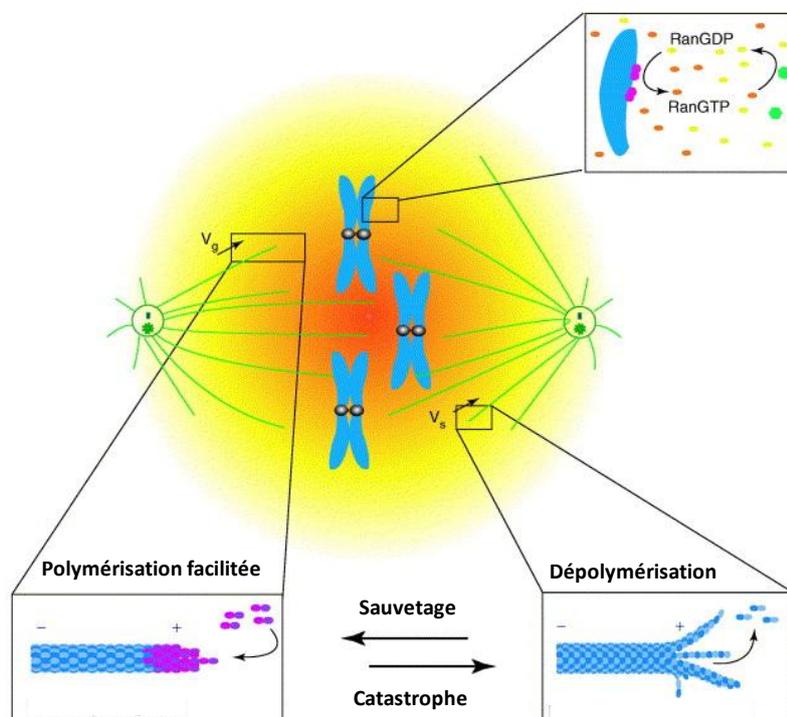


Schéma 6 : Mise en place du fuseau mitotique.

La mise en place du fuseau mitotique est le résultat de deux mécanismes. Les centrosomes sont responsables de la nucléation et de l'élongation des microtubules (en vert). Le gradient de RanGTP se concentre autour des chromosomes. Dans la zone où RanGTP est majoritaire (en orange), la polymérisation est facilitée. Dans la zone où RanGDP est majoritaire (en jaune), la polymérisation est défavorisée et les microtubules sont instables. D'après (Mogilner, Wollman et al. 2006).

2.1.3.4.2 Régulation via les protéines non motrices

Plusieurs protéines non motrices influencent la mise en place du fuseau mitotique. Certaines de ces protéines agissent dans la mise en place du fuseau mitotique en permettant la stabilisation des microtubules, en modifiant leur organisation ou en permettant leur nucléation. La protéine Numa lie les extrémités (-) des microtubules entre elles au niveau du centrosome, ce qui permet de regrouper les microtubules autour des pôles (Merdes, Heald et al. 2000). Bien que Numa ne soit pas une protéine motrice, sa localisation aux pôles du fuseau est possible grâce à sa liaison avec le complexe des protéines motrices Dynéine/Dynactine qui se déplace vers les extrémités (-) des microtubules. Il semble que la protéine TPX2 ait les mêmes propriétés et permet de focaliser les microtubules, bien que son rôle ne devienne indispensable qu'en absence de Numa (Manning and Compton 2007). Les membres de la famille des protéines TACC interagissent avec les microtubules au niveau des centrosomes et les stabilisent (Gergely, Karlsson et al. 2000; Lee, Gergely et al. 2001; Barros, Kinoshita et al. 2005). La protéine HURP se localise au niveau des kinétochores pendant la mitose et semble avoir un rôle dans la stabilisation des microtubules à proximité des kinétochores. Cette stabilisation permettrait d'augmenter la concentration des microtubules attachés aux kinétochores (Koffa, Casanova et al. 2006; Sillje, Nagel et al. 2006). La protéine NuSAP est une RanGTPase localisée sur les chromosomes et permet la stabilisation des microtubules associés aux bras des chromosomes. En liant les microtubules entre eux et aux chromosomes, NuSAP intervient dans la mise en place du fuseau de microtubules et le mouvement des chromosomes (Ribbeck, Groen et al. 2006; Ribbeck, Raemaekers et al. 2007).

2.1.3.4.3 Régulation via des protéines motrices

Les protéines motrices, ou moteurs moléculaires, sont des protéines particulières qui ont la capacité d'une part de se lier aux polymères du cytosquelette, d'autre part d'hydrolyser l'ATP et d'utiliser cette énergie de façon motrice en se déplaçant sur ces polymères. Il existe trois super-familles de moteurs moléculaires, il s'agit des Myosines, de la famille des Dynéines et de la famille des Kinésines. Les Kinésines et la Dynéine en particulier sont indispensables à la mise en place du fuseau mitotique. Elles sont responsables de la séparation des centrosomes en début de mitose, puis constituent les forces principales qui conduisent à la polarisation du fuseau et

qui vont déterminer la distance entre les pôles et les chromosomes. Elles jouent de ce fait un rôle dans la congression, c'est-à-dire le mouvement des chromosomes vers la plaque métaphasique et leur alignement, puis dans la ségrégation des chromosomes. Un modèle résumant l'activité des protéines motrices dans l'organisation du fuseau est présenté dans le schéma 7.

La famille des Kinésines représente un très grand nombre de protéines subdivisées en 14 super-familles (Lawrence, Dawe et al. 2004). Les Kinésines peuvent se mouvoir soit de l'extrémité (+) vers l'extrémité (-) des microtubules, soit dans le sens inverse, selon la famille à laquelle elles appartiennent. Ces moteurs moléculaires ont de multiples fonctions dans la cellule, notamment de transport, mais aussi d'organisation du cytoplasme.

La protéine Eg5, de la famille des kinésines-5, est indispensable à la mise en place d'un fuseau de microtubules bipolaire et intervient dans la séparation des deux centrosomes en début de prophase (Kapoor, Mayer et al. 2000). Eg5 a aussi un rôle dans le maintien de la structure antiparallèle du fuseau en liant deux microtubules interpolaire venant des pôles opposés (*crosslinking*) au niveau de leurs extrémités (+). De plus Eg5 se dirige vers les extrémités (+), ce qui a pour effet de repousser les pôles du fuseau (Kapitein, Peterman et al. 2005). Ce moteur aurait aussi un rôle dans la dynamique des microtubules pendant la métaphase, notamment dans le flux vers les pôles (*microtubules poleward flux*) que l'on observe pendant cette phase et dont dépend la ségrégation des chromatides (Miyamoto, Perlman et al. 2004)

Parmi les protéines motrices de la famille des Kinésines-13, plusieurs jouent un rôle pendant la mitose. Les protéines Kif2a et Kif2b jouent un rôle dans l'établissement du fuseau mitotique et les cellules déficientes pour Kif2b présentent des fuseaux monopolaires ou désorganisés, ainsi que des défauts lors de la cytokinèse (Ganem and Compton 2004; Manning, Ganem et al. 2007). La protéine MCAK joue un rôle dans la congression des chromosomes et l'attachement des microtubules aux kinétochores (Kline-Smith, Khodjakov et al. 2004). MCAK semble être impliquée dans la correction des erreurs d'attachements, via la dépolymérisation des microtubules mal attachés aux kinétochores (Ems-McClung, Hertzler et al. 2007). MCAK est localisé au niveau des centromères et des pôles du fuseau pendant la mitose. Une combinaison de phosphorylations de MCAK sur différents sites de la protéine permet à la protéine kinase

Aurora B de réguler la localisation et l'activité de dépolymérisation de MCAK (Lan, Zhang et al. 2004; Knowlton, Lan et al. 2006).

La protéine KIF18A, de la famille des Kinésines-8 a récemment été impliquée dans le phénomène de congression des chromosomes, (Mayr, Hummer et al. 2007). Cette Kinésine se déplace vers les extrémités (+). Elle interviendrait en dépolymérisant les microtubules à l'extrémité (+) à partir d'une certaine concentration critique. L'accumulation de cette protéine proportionnellement à la taille du microtubule permettrait ainsi d'éviter que les fibres kinétochoriennes ou les microtubules ne deviennent trop longs.

La protéine CENP-E est une protéine qui s'accumule aux niveaux des kinétochores en métaphase (Yen, Li et al. 1992). Il s'agit d'une protéine motrice dirigée vers l'extrémité (+) des microtubules et dont l'activité est indispensable à la congression des microtubules en métaphase (Wood, Sakowicz et al. 1997). CENP-E permettrait l'attachement des microtubules aux kinétochores et en même temps l'inactivation du point de contrôle mitotique (Mao, Desai et al. 2005). Sa localisation aux kinétochores dépend de la protéine Aurora B (Ditchfield, Johnson et al. 2003).

Un groupe particulier de kinésines, dites les chromokinésines, comprend des protéines motrices dirigées vers les extrémités (+) des microtubules, qui appartiennent toutes aux familles des Kinésines-4 et Kinésines-10. On retrouve les moteurs KIF4A et Kid chez l'homme (Mazumdar and Misteli 2005). Ces protéines ont la particularité de se lier à l'ADN et d'avoir, en interphase, une localisation nucléaire. En mitose, en plus de leur localisation sur le fuseau de microtubule, on les retrouve sur les bras des chromosomes. L'utilisation de siRNA contre Kif4A a mis en évidence son rôle dans la condensation des chromosomes en début de prophase ainsi que l'organisation du fuseau mitotique. Kif4a interagit directement avec les complexes des Condesines I et II et pourrait réguler celles-ci (Mazumdar, Sundareshan et al. 2004). Elle joue aussi un rôle dans l'organisation du fuseau central de microtubules qui est important pour la cytokinèse (Kurasawa, Earnshaw et al. 2004). La protéine Kid jouerait un rôle dans le mouvement des bras des chromosomes en mitose, et ce mouvement serait important pour l'orientation des chromosomes mais pas pour la congression vers la plaque métaphasique (Levesque and Compton 2001). Parallèlement, Kid intervient dans l'organisation du fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique (Levesque, Howard et

al. 2003). Récemment, Kid a été impliquée dans la réorganisation de la membrane nucléaire en fin de mitose (Ohsugi, Adachi et al. 2008)

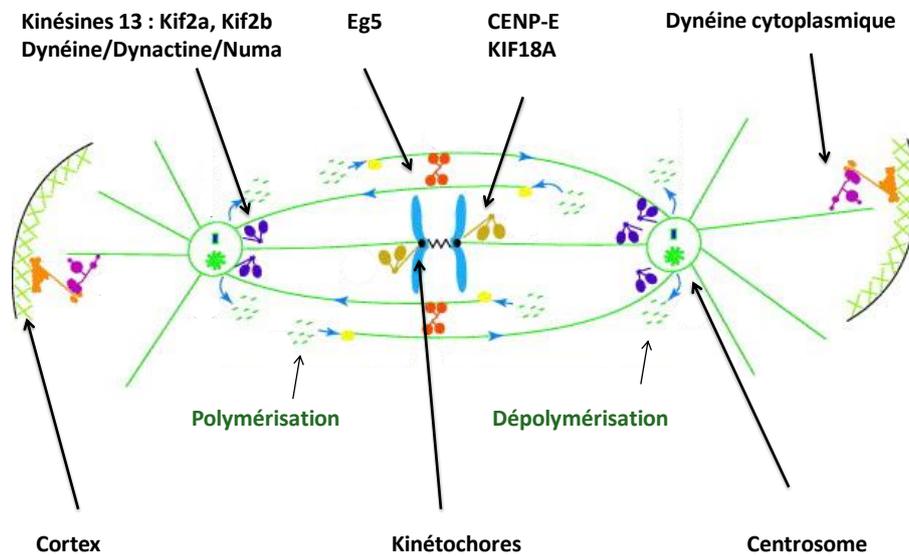


Schéma 7 : Modèle simplifié de l'organisation du fuseau par les moteurs moléculaires.

Différents moteurs moléculaires régulent l'organisation et la position du fuseau mitotique. Les Kinésines kifa et kif2b régulent la dynamique des microtubules aux centrosomes. Le complexe Dynéine/Dynactine/Numa assure le regroupement des extrémités (-) autour des pôles. Eg5 se lie aux microtubules interpolaire et rallonge le fuseau en glissant entre les microtubules et en repoussant les pôles. CENP-E et KIF18A régulent l'interaction entre les fibres kinétochoriennes et les kinétochores et ont un rôle dans le raccourcissement des microtubules lors de la congression des chromosomes. La Dynéine cytoplasmique se lie à la membrane et stabilise le fuseau mitotique. D'après (Mogilner, Wollman et al. 2006)

La famille des Dynéines comprend des moteurs moléculaires qui se déplacent le long des microtubules vers l'extrémité (-). La Dynéine fonctionne en complexe avec la Dynactine, qui lui confère sa spécificité et qui contribue au mouvement le long des microtubules. La Dynéine est un complexe composé de deux chaînes lourdes sur lesquelles on retrouve le domaine moteur, et des sous-unités plus petites (chaînes légères, chaînes intermédiaires, et chaînes intermédiaires légères) qui seraient responsables de la spécificité de son activité cargo (qui permet de transporter d'autres protéines). La Dynactine est un complexe d'au moins 11 polypeptides différents qui s'assemblent et forment un domaine de liaison au domaine moteur

de la Dynéine, et un domaine de liaison au domaine cargo. Le domaine de liaison au domaine moteur comprend p150^{glued}, qui se lie aussi aux microtubules, et p50-Dynamitine.

Parmi les Dynéines, la sous-famille des Dynéines cytoplasmiques joue un rôle important dans le transport intracellulaire des vésicules via les microtubules. En interphase, elles permettent les déplacements de vésicules qui leur sont associées, vers le centre de la cellule, où se trouve le centrosome qui regroupe les extrémités (-) des microtubules (Niclas, Allan et al. 1996). La Dyneine intervient dans la localisation des organelles, dont l'appareil de Golgi, et permet le maintien des extrémités (-) des microtubules autour du centrosome (Corthesy-Theulaz, Pauloin et al. 1992; Burakov, Kovalenko et al. 2008).

La Dyneine est importante pour le déroulement de la mitose et intervient dans de multiples mécanismes via différentes sous-unités (Lee, Kaiser et al. 2005). Elle joue un rôle dès le début de prophase dans l'établissement du fuseau mitotique, puis dans la régulation de l'élongation du fuseau en métaphase via le transport de molécules capables de dépolymériser les microtubules (Vaisberg, Koonce et al. 1993; Gaetz and Kapoor 2004). Elle intervient aussi, avec la protéine Numa, en regroupant les extrémités (-) des microtubules autour des pôles du fuseau mitotique (Merdes, Ramyar et al. 1996; Merdes, Heald et al. 2000; Goshima, Nedelec et al. 2005). De plus, la Dyneine transporte vers les pôles du fuseau mitotique où est localisée la Cycline B, la protéine Emi1. Emi1 est un inhibiteur de l'APC/C, en localisant cette protéine près de la Cycline B, la Dynéine permet la stabilisation de la Cycline B nécessaire à l'élaboration du fuseau mitotique (Ban, Torres et al. 2007). La Dynéine cytoplasmique se lie à la membrane cytoplasmique d'une part et aux extrémités (+) des microtubules astraux d'autre part. Le mouvement vers les pôles va dans ce cas particulier permettre à la fois de positionner les pôles et de contrebalancer les forces des autres protéines motrices pour stabiliser le fuseau mitotique (Akhmanova and Steinmetz 2008).

Il existe différents types d'attachement entre les microtubules et les kinétochores selon les pôles du fuseau dont sont originaires les microtubules. Ces attachements sont résumés dans le schéma 8.

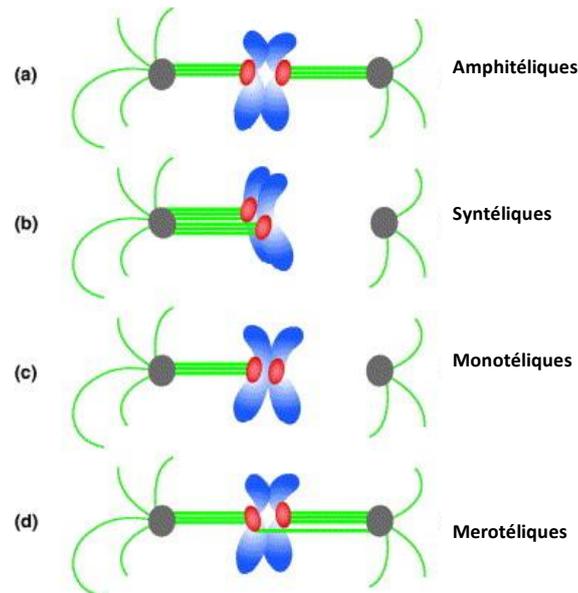


Schéma 8 : Différents types d'attachement des microtubules aux kinétochores.

Les microtubules peuvent s'attacher aux kinétochores de différentes façons. (a) La plupart du temps, les chromosomes sont dit amphitéliques, c'est-à-dire que chacun des kinétochores est attaché à un pôle différent du fuseau. Cette configuration est considérée comme normale. (b) Lorsque les deux kinétochores sont attachés au même pôle, on parle de chromosome syntélique. (c) Si un seul kinétochore est attaché à des microtubules, on parle de chromosome monotélique. (d) Dans le cas où un des deux kinétochores est attaché aux deux pôles du fuseau, on parle de chromosome merotélique. Les attachements (b), (c), et (d) sont considérés anormaux.

2.1.4 Le centrosome

2.1.4.1 Rôle

In vivo, les microtubules sont nucléés et organisés à partir du centre organisateur des microtubules ou MTOC (pour *Microtubule Organising Center*) (Murphy and Stearns 1996). Chez les mammifères supérieurs le rôle de MTOC est tenu par le centrosome. La nucléation des microtubules se produit à partir d'un complexe qui sert de modèle, le γ -TuRC, constitué notamment de Tubuline- γ (Raynaud-Messina and Merdes 2007). Le centrosome sert de plateforme autour de laquelle sont regroupées les extrémités (-) des microtubules et d'origine à partir de laquelle le réseau de microtubules s'organise. Au cours du cycle cellulaire, le centrosome se duplique de façon semi-conservative pour aboutir en début de mitose à deux centrosomes qui seront distribués dans chacune des cellules filles. En interphase, le centrosome

occupe le centre de la cellule, à proximité du noyau cellulaire. Dans certaines cellules différenciées, la composition du centrosome est modifiée : le γ -TuRC se répartit entre plusieurs sites cytoplasmiques qui vont permettre la nucléation et parallèlement les centrioles deviennent l'origine des cils primaires (Raynaud-Messina and Merdes 2007). En mitose, les deux centrosomes forment les pôles du fuseau mitotique. Au delà de sa fonction d'organisateur du cytosquelette de microtubules, le centrosome est une plateforme sur laquelle un grand nombre de protéines se localisent et sont phosphorylées (Doxsey, Zimmerman et al. 2005). D'autre part, un rôle potentiel dans les événements finaux de clivage de la membrane en cytokinèse a été décrit dans certaines lignées cellulaires (Piel, Nordberg et al. 2001). Dans ces cellules, le centriole père d'une des deux cellules filles se déplace jusqu'au site de clivage juste avant que les deux cellules filles ne se séparent. Par ailleurs, un nombre grandissant de protéines centrosomales semblent impliquées en cytokinèse (Gromley, Jurczyk et al. 2003; Fabbro, Zhou et al. 2005; Tsang, Spektor et al. 2006). Il a été proposé que le centrosome, de par sa fonction de plateforme, pourrait servir d'origine à la signalisation d'un grand nombre de mécanismes de régulations du cycle cellulaire (Doxsey, Zimmerman et al. 2005; Srsen, Gnadt et al. 2006; Srsen and Merdes 2006; Mikule, Delaval et al. 2007). Les cellules cancéreuses ont souvent un nombre anormal de centrosomes, mais on ignore si cette anomalie est une cause ou une conséquence de la cancérogénèse.

2.1.4.2 Structure

En début de phase G1, le centrosome se compose de deux centrioles disposés perpendiculairement et liés entre eux au niveau de leur région proximale par une matrice composée principalement de protéines surenroulées (*coiled-coil proteins*) de la famille de la Péricentrine (Azimzadeh and Bornens 2007). Chaque centriole est formé de 9 groupes de 3 microtubules. Les microtubules internes sont complets et les microtubules médians et externes sont incomplets. Un système central et des rayons associent les différents groupes de microtubules. De plus, les microtubules internes sont reliés aux microtubules externes d'un autre groupe. Les deux centrioles sont entourés d'une matrice appelée matériel péricentriolaire, qui se forme autour de la matrice de protéines surenroulées. On distingue un centriole père et un

centriole père. Le centriole fils est le centriole qui a été dupliqué le plus récemment, il est le plus court et est considéré «immature». Le centriole père est reconnaissable grâce à la présence de deux sets de 9 appendices, sur sa partie distale, qui sont le signe de sa maturation (cf. schéma 9), les appendices distaux et sub-distaux (Doxsey 2001; Azimzadeh and Bornens 2007).

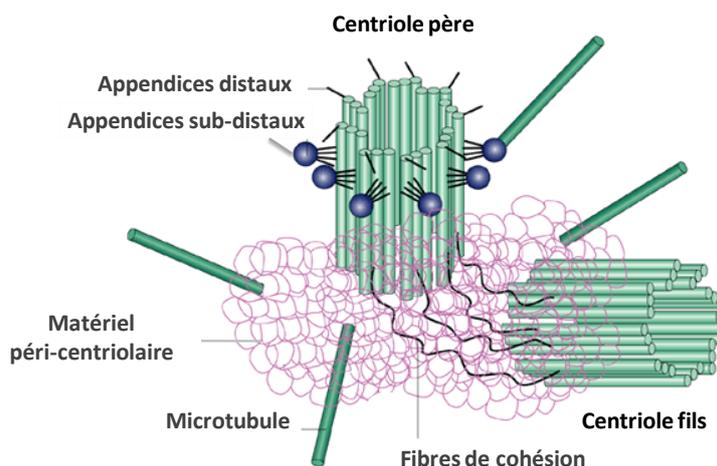


Schéma 9 : Structure du centrosome

Le centrosome est formé de deux centrioles positionnés perpendiculairement l'un à l'autre et reliés entre eux par des fibres de cohésion et une matrice de matériel péri-centriolaire. On distingue le centriole père du centriole fils grâce à ses appendices distaux et sub distaux. Le matériel péri-centriolaire permet la nucléation des microtubules. D'après (Doxsey 2001).

2.1.4.3 *Le cycle de duplication du centrosome*

Le centrosome se duplique selon plusieurs étapes formant un cycle lié au cycle cellulaire. Dans un premier temps, les deux centrioles qui étaient attachés perpendiculairement en mitose vont se séparer physiquement. On appelle cette étape le désengagement. Elle se produit en début de phase G1 et nécessite l'activité de la Séparase, une enzyme aussi nécessaire à la ségrégation des chromosomes en mitose (Azimzadeh and Bornens 2007). Au cours de la phase G1, les deux extrémités proximales des centrioles vont se lier de façon lâche via des fibres de cohésion (Bahe, Stierhof et al. 2005). A la transition G1/S, sous l'influence du complexe Cycline E-Cdk2, la croissance de deux nouveaux centrioles est initiée. Chacun des nouveaux centrioles

croît à partir de l'extrémité proximale d'un ancien centriole, et perpendiculairement à celui-ci (Tsou and Stearns 2006). L'élongation des nouveaux centrioles continue jusqu'en fin de phase G2. La phase G2 est aussi une phase de maturation pour les deux centrosomes, et cette maturation est régulée par les protéines kinases Aurora A et Plk1 (Barr and Gergely 2007). Pendant la phase G2, le centriole fils (le plus immature des deux anciens centrioles) va acquérir des appendices. En début de phase M, les fibres assurant la cohésion entre les deux doublés de centrioles sont rompues et les deux centrosomes se séparent et forment les pôles du fuseau mitotique. Ce cycle est représenté sur le schéma 10.

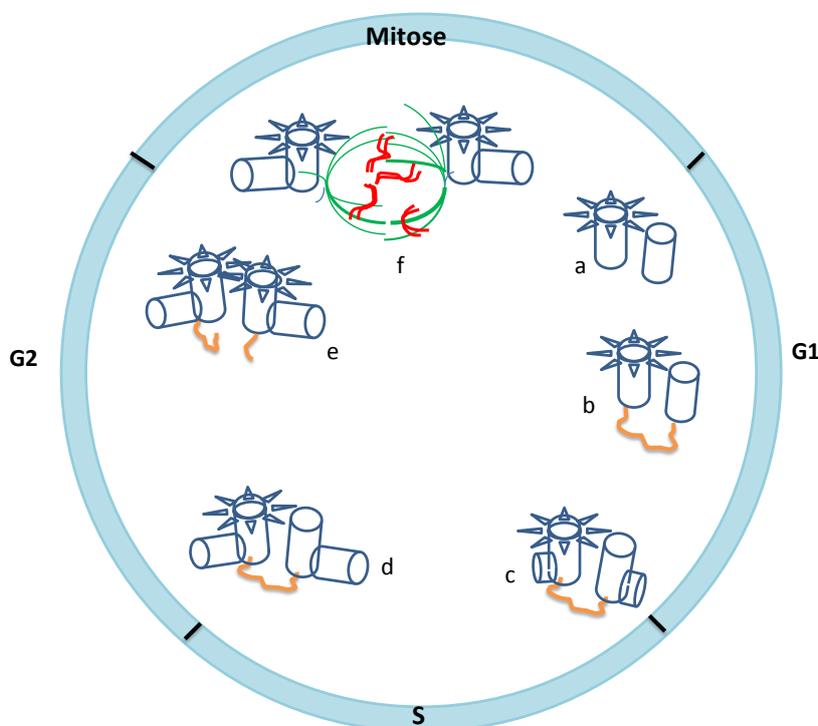


Schéma 10 : Cycle de duplication du centrosome.

Le centrosome est dupliqué une seule fois au cours du cycle cellulaire. En phase G1, les cellules contiennent un seul centrosome formé de deux centrioles : un centriole père mature et un centriole fils immature. L'initiation de la duplication de nouveaux centrioles correspond à la transition G1/S. Lors de la phase G2, le centriole fils acquiert des appendices sur sa partie distale. En début de mitose, la cellule contient deux centrosomes identiques qui vont se séparer pour former les pôles du fuseau mitotique.

2.1.4.4 Centrosome et régulation du cycle cellulaire

Le cycle de duplication du centrosome est régulé de façon à ce que le centrosome soit dupliqué une seule fois par cycle cellulaire. Cette régulation intervient d'une part en permettant la duplication en phase G1, d'autre part en inhibant l'assemblage du centrosome pour éviter la re-duplication en phase G2 (Tsou and Stearns 2006). Ces mécanismes font intervenir des molécules qui régulent par ailleurs le cycle cellulaire, comme le complexe CyclineE-Cdk2 ou la protéine Séparase, permettant ainsi de coordonner les deux cycles et d'éviter la multiplication des centrosomes (Tsou and Stearns 2006). Néanmoins, la multiplication des centrosomes par re-duplication peut se produire lorsque la phase S est prolongée par inhibition de la réplication de l'ADN (Wong and Stearns 2003). Les dommages à l'ADN, qui impliquent un arrêt ou un ralentissement du cycle cellulaire sont aussi susceptibles de provoquer des amplifications du nombre de centrosomes (Dodson, Bourke et al. 2004). Certaines modifications affectant la protéine p53 ou induisant la surexpression de Cycline E conduisent aussi à la duplication anormale des centrosomes (Fukasawa, Choi et al. 1996; Mussman, Horn et al. 2000). Les cellules cancéreuses présentent souvent un nombre anormal de centrosomes, ce qui pourrait être une cause du processus de cancérogénèse ou bien une conséquence des mutations affectant les mécanismes de régulation du cycle cellulaire, qui sont très fréquentes dans les tumeurs.

Par ailleurs, un certain nombre de travaux ont pu mettre en avant un rôle potentiel pour le centrosome dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, la « perte » ou le « manque » de centrosome semble induire un arrêt des cellules en phase G1. Les cellules dont le centrosome a été éliminé par microchirurgie ou par utilisation de laser s'arrêtent en G1 après avoir traversé la mitose sans centrosome (Hinchcliffe, Miller et al. 2001; Khodjakov and Rieder 2001). Récemment pourtant, les mêmes expériences ont été réalisées dans des cellules qui se trouvaient déjà en phase G1 au moment de l'ablation du centrosome (Uetake, Loncarek et al. 2007). Dans ce cas, les cellules sont capables de progresser jusqu'en phase S, sauf si elles sont soumises à un stress exogène, auquel cas elles restent arrêtées en phase G1. Ainsi, l'ablation du centrosome pourrait arrêter les cellules du fait d'un stress que cette absence crée pendant la division (Srsen and Merdes 2006). Par ailleurs, lorsque l'intégrité du centrosome est compromise par la diminution de protéines centrosomales, les cellules s'arrêtent en phase G1 et

cet arrêt dépend des protéines p38MAPK, p53 et p21 (Srsen, Gnad et al. 2006; Mikule, Delaval et al. 2007). Ceci pourrait être la réponse cellulaire à cette modification de la plateforme que constitue le centrosome.

2.2 Vie et mort des cellules somatiques

2.2.1 Introduction

En 1961, Hayflick observa que les cellules issues de tissus normaux et mises en culture ne proliféraient pas indéfiniment (Hayflick and Moorhead 1961). Il tira de ces observations la conclusion empirique que les cellules primaires, donc non transformées, ont une durée de vie limitée à un certain nombre de divisions cellulaires et que cette régulation est un mécanisme qui dépend de signaux intracellulaires (Hayflick 1965). La notion de limite de Hayflick met en avant la notion que la vie et la mort des cellules normales est régulée et que cette régulation est liée à la division des cellules.

Les eucaryotes supérieurs prolifèrent par division cellulaire, une cellule donnant naissance à deux cellules filles identiques. Les cellules se divisent selon une séquence d'évènements régulés finement appelée le cycle cellulaire. Chez les eucaryotes supérieurs, ce cycle est sensiblement différent dans les cellules embryonnaires, les cellules germinales ou les cellules somatiques. Je décrirais plus précisément le cycle cellulaire des cellules somatiques. La régulation de la prolifération des cellules fait aussi intervenir des mécanismes de sénescence et de mort cellulaire programmée, dont certains sont mis en place pour pallier à des erreurs apparaissant au cours de la division des cellules.

2.2.2 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes traversées par une cellule somatique lors de sa division en deux cellules filles identiques, contenant chacune la même information génétique. On décrit habituellement le cycle cellulaire en deux périodes, l'interphase et la phase M (cf. schéma 11). L'interphase regroupe trois phases fonctionnellement distinctes. Ces phases sont les phases G1 (*Gap1*), S (*Synthèse*), G2 (*Gap2*). On décrit aussi la phase G0, qui comprend des cellules quiescentes ne se divisant plus mais dont le métabolisme reste actif. Les cellules quiescentes sont susceptibles d'entrer à nouveau dans le cycle cellulaire et de proliférer après stimulation via des signaux mitogènes. La phase M regroupe la mitose et la cytokinèse.

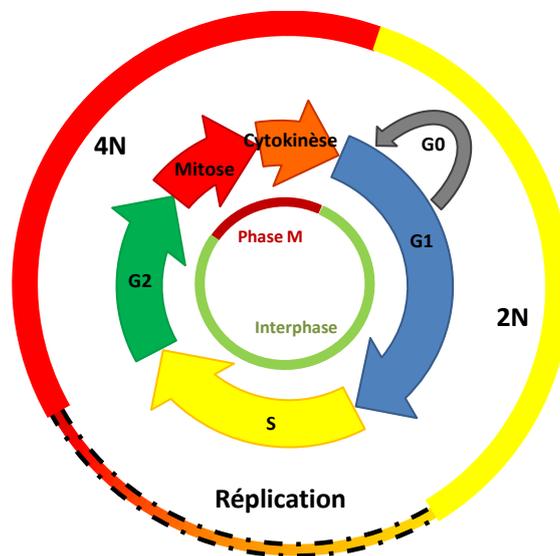


Schéma 11 : représentation des phases du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est constitué d'un enchaînement d'étapes conduisant à la réplication de l'ADN puis à la répartition de l'ADN en deux cellules filles. En phase G1 la cellule contient 2N chromosomes. En phase S chaque chromatide est répliquée. En phase G2 la cellule contient 4N chromosomes, chaque chromosome ayant 2 chromatides. Pendant la mitose les chromatides sœurs de chacun des chromosomes sont séparés et répartis entre les deux cellules filles.

2.2.2.1 Les différentes phases du cycle cellulaire

L'interphase est la période du cycle cellulaire pendant laquelle les cellules dupliquent leur matériel génétique et augmentent leur volume et leur masse avant la division. Pendant cette période, la synthèse de protéine est importante et permet la réplication de l'ADN, la duplication du centrosome, l'augmentation du volume cellulaire et de la quantité d'organites cellulaires, qui seront répartis entre les cellules filles pendant la phase M (Alberts 2002).

La phase G1 est la plus longue du cycle cellulaire. Elle recouvre deux phénomènes importants. Dans un premier temps, les cellules sorties de phase M ou bien quiescentes vont intégrer des signaux différents et décider ou non d'entamer un nouveau cycle cellulaire. Dans un deuxième temps, une fois cette décision prise, les cellules vont activer la transcription de gènes essentiels à la duplication de l'ADN et du centrosome, qui se produisent en phase S. Dans la première partie de la phase G1, les cellules sont particulièrement sensibles aux stimuli mitogènes externes. Sous l'influence de signaux prolifératifs ou mitogènes, les cellules s'engagent plus avant dans la phase G1 et passent le point de restriction, après lequel elles sont engagées dans un nouveau cycle cellulaire complet.

La phase S se caractérise par la réplication du matériel génétique. L'ADN est répliqué de façon semi conservative, ainsi les chromatides anciennement et nouvellement synthétisés sont identiques. Au cours de cette phase les centrioles qui constituent le centrosome sont aussi dupliqués. La duplication du centrosome et celle du matériel génétique sont coordonnées par des acteurs de la régulation du cycle cellulaire.

Durant la phase G2 la cellule contrôle la duplication de l'ADN et les éventuelles erreurs commises et se prépare à la mitose. Cette phase correspond à une phase de synthèse intense qui mène à un volume cellulaire plus important. En fin de phase G2 les chromosomes commencent à se condenser.

La phase M est la phase du cycle pendant laquelle la cellule va effectivement opérer sa division en deux cellules filles identiques. Les différentes étapes conduisant à la ségrégation des chromosomes et leur répartition entre deux cellules filles font partie de la mitose. En plus de chromatides identiques, les deux cellules filles reçoivent grâce à ce mode de division, une

quantité semblable d'organelles qui ont été dupliquées en phase S et G2. La mitose se divise en phases morphologiquement distinctes que sont la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La cytokinèse termine la phase M. Elle correspond à la phase d'individualisation des deux cellules filles et de clivage de la membrane qui va permettre leur indépendance et va marquer la fin de la division.

2.2.2.2 Description de la phase M

Lors de la prophase, première phase de la mitose, la membrane nucléaire se désassemble en même temps que les chromosomes se condensent. Parallèlement les deux centrosomes comportant chacun deux centrioles, vont se séparer et s'éloigner jusqu'à se disposer de part et d'autre des chromosomes, de façon symétrique. Dans le même temps, les microtubules sont devenus plus dynamiques et s'arrangent en un fuseau à partir de pôles formés par les centrosomes.

En métaphase les chromosomes s'alignent progressivement sur la plaque métaphasique, un disque situé au centre du fuseau mitotique. On distingue la prométaphase, pendant laquelle les chromosomes se positionnent correctement à l'aide des microtubules, de la métaphase proprement dite où ils sont alignés sur la plaque métaphasique. Les microtubules forment alors un réseau bipolaire de microtubules antiparallèles appelé le fuseau mitotique. Au cours de la prométaphase, les microtubules se lient progressivement aux kinétochores, des structures protéiques localisées au niveau des centromères.

En anaphase les deux chromatides sœurs de chaque chromosome se séparent et chacune est attirée vers un pôle du fuseau par le biais du raccourcissement des microtubules, formant ainsi deux pools de chromosomes. Pendant cette phase très courte, le fuseau central de microtubules commence à s'organiser.

En télophase, les deux pools de chromosomes sont chacun à un pôle du fuseau. Les microtubules s'organisent en un réseau antiparallèle au centre de la cellule appelé le fuseau central. Au fur et à mesure de l'avancement de la télophase, le fuseau central se compacte et

son centre forme une structure appelée corps intermédiaire. A mi-distance entre les deux extrémités de la cellule qui vont former les cellules filles, juste sous la membrane cellulaire et liée à celle-ci, se forme l'anneau contractile. Il s'agit d'une structure composée de fibres d'Actine et de Myosine qui se contracte, séparant ainsi les deux nouvelles cellules filles.

La cytokinèse correspond à la fin des événements de mitose et amorce la transition avec la phase G1. Lors de cette phase, les cellules restaurent leur membrane nucléaire et décondensent leurs chromosomes. A ce stade, l'anneau d'Acto-Myosine s'est contracté jusqu'à rejoindre le fuseau central de microtubules qui s'est compacté en une petite structure, appelée le corps intermédiaire, prolongée de part et d'autre de quelques fuseaux de microtubules. Peu à peu le fuseau central de microtubules et le réseau d'Actine se dépolymérisent, ne laissant subsister que le corps intermédiaire dense aux électrons. Dans le même temps, comme le cytosquelette d'Actine se réorganise, les cellules commencent à former à nouveaux des contacts avec la matrice extracellulaire et à adhérer à celle-ci. La cytokinèse se termine avec le clivage de la membrane plasmique au niveau du corps intermédiaire permettant la séparation physique des deux cellules filles. Ces étapes sont résumées sur le schéma 12.

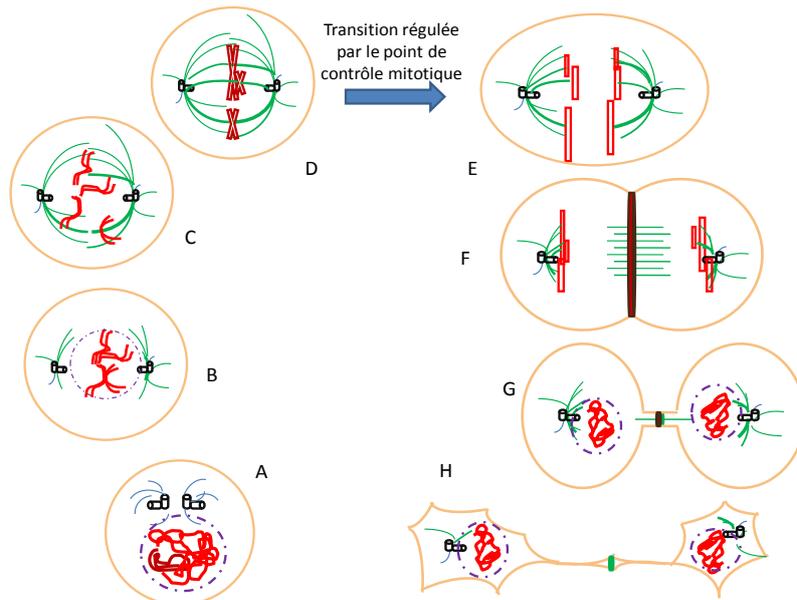


Schéma 12 : Description de la phase M.

A : Cellule en début de prophase. Les centrosomes ne sont pas encore séparés. L'ADN se condense dans le noyau toujours délimité par la membrane nucléaire. **B** : Cellule en fin de prophase et début de prométaphase. La membrane nucléaire disparaît, les centrosomes se sont séparés et se localisent de façon à former les pôles du fuseau mitotique. **C** : cellule en prométaphase. Les chromosomes s'alignent peu à peu sur la plaque métaphasique grâce au fuseau de microtubules. **D** : Cellule en métaphase. Les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique. **E** : Cellule en anaphase. Les chromatides sœurs se séparent et les deux pools de chromosomes sont attirés chacun vers un pôle. **F** : Cellule en télophase. Les microtubules forment un fuseau central autour duquel l'anneau contractile d'Acto-Myosine se construit et sépare les deux futures cellules filles. **G** : Cellule en fin de télophase. L'anneau d'Acto-Myosine s'est contracté jusqu'au corps intermédiaire formé de Tubuline. La membrane nucléaire se reforme et les chromosomes commencent à se décondenser. **H** : Cellule en cytokinèse. Les cellules s'attachent à nouveau à la matrice, l'ADN est décondensé et l'anneau contractile s'est dépolymérisé. Le corps intermédiaire formé de Tubuline est toujours présent, mais le fuseau central a disparu.

2.2.2.3 Les intervenants moléculaires de la mitose

Pendant la mitose, la cellule organise un complet réarrangement du cytosquelette, un remodelage des chromosomes, une répartition particulière des organelles ainsi qu'une modification de la membrane nucléaire et de la membrane plasmique. Toutes ces modifications indispensables sont le fait d'intervenants moléculaires particuliers.

Parmi les intervenants moléculaires nécessaires au bon déroulement de la mitose, on retrouve les moteurs moléculaires qui régulent la forme et l'activité des cytosquelettes d'actine et de microtubules ainsi que la position des centrosomes (voir introduction sur le cytosquelette). On trouve aussi les complexes protéiques responsables de la compaction et de l'organisation des chromosomes, les kinétochores et les molécules impliquées dans le point de contrôle mitotique et la régulation de l'APC/C (décrit dans le chapitre des points de contrôle), et le complexe des protéines passagères dont le rôle majeur semble être la coordination de tous ces événements. Tous ces éléments interviennent dans la formation ou le fonctionnement du point de contrôle mitotique.

2.2.2.3.1 Les complexes régulant la compaction et l'organisation des chromosomes

Les chromosomes mitotiques sont composés d'environ 1/3 d'ADN, 1/3 d'Histones et 1/3 de protéines associées qui sont responsables de la forme caractéristique des chromosomes en métaphase (Decordier, Cundari et al. 2008). Un mécanisme, dit *Chromosome Scaffold*, fait intervenir à la fois des protéines se liant à l'ADN et des séquences d'ADN spécifiques et permet l'organisation particulière de la chromatine en mitose. De plus, un complexe de protéines appelé Cohésine permet l'attachement des deux chromatides sœurs et régule leur séparation au moment de la transition métaphase/anaphase.

Le *Chromosome Scaffold* est constitué des protéines Topoisomérase II (une protéine permettant la décaténation de l'ADN) et Smc2 (une sous unité du complexe Condensine) (Hirano and Mitchison 1994). Ces protéines se lient à des séquences spécifiques d'ADN, les SAR (*Scaffold Attachment Region*) qui définissent les limites de boucles d'ADN (Strick and Laemmli 1995; Almagro, Riveline et al. 2004).

La Topoisomérase II est une enzyme permettant la décaténation des brins d'ADN. Elle est impliquée dans un grand nombre de mécanismes dont la réparation, la réplication, la recombinaison et la transcription de l'ADN (Decordier, Cundari et al. 2008). La Topoisomérase II a été impliquée dans le déclenchement d'un point de contrôle lié au stress mais indépendant des dommages à l'ADN en phase G2 (Mikhailov, Shinohara et al. 2004). La décaténation de l'ADN

est importante pour le bon déroulement de la mitose et son inhibition conduit à un arrêt des cellules en métaphase et une activation du point de contrôle mitotique (Skoufias, Lacroix et al. 2004; Toyoda and Yanagida 2006). La Topoisomérase II est régulée en mitose par phosphorylation, sous la dépendance de la kinase Plk1 et de la phosphatase PP2A (Escargueil and Larsen 2007; Li, Wang et al. 2008). Le rôle de la Topoisomérase II en mitose serait de permettre la résolution correcte des centromères au moment de la ségrégation des chromatides afin d'éviter de former des ponts de chromatine (*Chromatine bridges*) susceptibles lors de la cytokinèse de subir des dommages à l'ADN.

Les complexes protéiques des Condensines sont composés de protéines Smc et de sous unités de Kleisines. Chez les vertébrés on trouve deux types de complexes Condensines, Condensine I et Condensine II. Les deux complexes partagent le même cœur de protéines (CAP-E/Smc2 et CAP-C/Smc4) mais contiennent des sous-unités régulatrices différentes (CAPD2 et CAP-G pour Condensine I, CAPD3 et CAP-G2 pour Condensine II) (Haering and Nasmyth 2003). Aurora B contrôle le recrutement des Condensines I sur les chromosomes mitotiques (Lipp, Hirota et al. 2007). Le recrutement des Condensines sur les chromosomes coïncide avec la phosphorylation de la Serine 10 de l'Histone H3 par la protéine kinase Aurora B, cette phosphorylation étant un marqueur de la condensation des chromosomes. Les Condensines jouent un rôle dans le point de contrôle mitotique en permettant le maintien de la tension au niveau des kinétochores en métaphase (Yong-Gonzalez, Wang et al. 2007). Ces complexes seraient régulés entre autre par les protéines phosphatases de type 1, les PP1 (Vagnarelli, Hudson et al. 2006).

2.2.2.3.2 Les kinétochores et les protéines du point de contrôle mitotique

Les kinétochores sont des structures protéiques qui s'organisent au niveau des centromères lors de la mitose. Ces structures jouent le rôle de plateformes sur lesquelles un grand nombre de protéines régulatrices se localisent et interagissent. C'est sur cette plateforme que les fibres kinétochoriennes viennent se fixer. Les kinétochores sont décrits dans la littérature comme étant formés de trois couches. On distingue la couche interne, la

couche externe et la couronne ou corona (Musacchio and Salmon 2007). L'ensemble des protéines qui se localisent sur les kinétochores est présenté sur le schéma 13.

Les kinétochores s'établissent au niveau des centromères par le biais de la protéine CENP-A, un variant de l'histone H3 spécifique des centromères. La région des centromères comprend un grand nombre de copies (de 1500 à 30 000) d'une séquence de 171 paires de bases répétées en tandem et appelée satellite α (Cleveland, Mao et al. 2003). Il existe deux familles majeures de satellites α , α -I qui est très conservée, et α -II dont la structure varie de façon importante. Lors de la condensation de la chromatine des centromères en prophase, les structures α -I sont retrouvées à l'extérieur du centromère, à la surface du chromosome, tandis que les structures α -II sont à l'intérieur. CENP-A forme des nucléosomes se liant principalement aux satellites de types α -I (Cleveland, Mao et al. 2003). Les protéines de la couche interne des kinétochores s'assemblent de façon hiérarchique et co-dépendante à partir de CENP-A selon la séquence : CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H, CENP-I et hMIS12. Ces protéines sont constitutives des kinétochores et restent localisées sur les séquences du centromère tout au long du cycle cellulaire (Decordier, Cundari et al. 2008). La couche externe des kinétochores et la corona se forment progressivement après l'entrée en mitose par accumulation de protéines dont la localisation est aussi co-dépendante.

La couche externe comprend notamment le complexe HEC1 qui joue un rôle dans l'attachement des fibres kinétochoriennes en métaphase (DeLuca, Gall et al. 2006). Les complexes KNL1, MIS12 et le complexe Mcm21 chez la levure s'associent aussi à la couche externe. Le complexe KNL1 semble déterminant dans la construction du kinétochoire et pour la localisation de protéines sur la corona (Cheeseman, Hori et al. 2008). Les complexes HEC1/KNL1/MIS12 forment un réseau responsable de l'attachement des microtubules aux kinétochores (Cheeseman, Chappie et al. 2006). Ces trois complexes augmentent l'attachement aux microtubules de façon synergique. La couche externe servira de plateforme sur laquelle les protéines du point de contrôle mitotique viennent se localiser et sont régulées (DeLuca, Howell et al. 2003).

La corona est la partie la plus externe et la plus dynamique des kinétochores. On y retrouve des protéines spécifiques des bouts (+) des microtubules dont les protéines Clasp, EB1, ch-TOG et CLIP170. On estime que le rôle de ces protéines aux kinétochores serait de

stabiliser les microtubules qui viennent s'y attacher (Tanaka, Stark et al. 2005). On trouve aussi la kinésine CENP-E qui intervient dans l'attachement des microtubules (Mao, Desai et al. 2005). Le complexe formé des protéines Rod/ZW10/ZWILCH vient se localiser sur la corona grâce à HEC1, et permet le recrutement du complexe Dynéine/Dynactine et de Mad1 et Mad2 (Karess 2005). Pendant la mitose, la Dynéine est recrutée aux kinétochores par le complexe formé des protéines Zw10/Rob qui se lie à p50-dynamitine, et migre vers les pôles du fuseau mitotique en transportant des protéines spécifiques vers les centrosomes (Howell, McEwen et al. 2001; Buffin, Lefebvre et al. 2005; Karess 2005). La Dynéine participe au point de contrôle mitotique de façon indirecte, en transportant et donc en régulant la localisation de protéines importantes pour l'activité de ce point de contrôle. En effet, la Dyneine est responsable du transport de la protéine Mad2 vers les pôles. Elle participe ainsi à la dynamique d'échange de cette protéine aux kinétochores et surtout à l'inactivation du point de contrôle mitotique en retirant Mad2 des kinétochores lors de la transition métaphase/anaphase (Howell, McEwen et al. 2001). L'activité du complexe Dynéine/Dynactine est régulée aux kinétochores par les protéines LIS1, Clip170, NudE et Nudel (Tai, Dujardin et al. 2002; Yan, Li et al. 2003; Stehman, Chen et al. 2007).

Les protéines du point de contrôle mitotique se localisent sur les kinétochores. C'est le cas de Bub1 et BubR1 qui sont recrutées sur les kinétochores via Bub3 (Musacchio and Salmon 2007), mais aussi de l'ubiquitine ligase APC/C et de Cdc20 qui régule sont activité (Acquaviva, Herzog et al. 2004). La localisation de Mad2 aux kinétochores induit son activation. On distingue deux formes de la protéine, une forme activée appelée Mad2-C et une forme inactive Mad2-O (De Antoni, Pearson et al. 2005; Yu 2006). La forme Mad2-C est retrouvée sur les kinétochores, la forme Mad2-O est soluble.

elles se dissocient rapidement des centromères et se relocalisent sur le fuseau central à mi-distance entre les chromosomes, puis au niveau du corps intermédiaire en cytokinèse. Le complexe des protéines passagères est composé d'INCENP, Aurora B, Survivine et Boréaline.

INCENP est la première des protéines passagères à avoir été identifiée (Cooke, Heck et al. 1987). INCENP se lie aux autres protéines passagères et agit de ce fait comme une protéine d'échaffaudage (*scaffold*) qui permet la formation du complexe (Adams, Wheatley et al. 2000; Bolton, Lan et al. 2002).

Aurora B est une sérine/thréonine kinase qui intervient dans un grand nombre de mécanismes pendant la mitose. La liaison à INCENP induit l'activation d'Aurora B, puis la phosphorylation d'INCENP, qui augmente encore l'activation de la kinase Aurora B, créant ainsi une boucle d'amplification (Honda, Korner et al. 2003).

Survivine est une protéine qui fait partie de la famille des protéines inhibitrices d'apoptose (*IAP : Inhibitor of Apoptosis Proteins*), mais son rôle d'inhibiteur de l'apoptose reste controversé (Lens, Vader et al. 2006). Le rôle de Survivine en mitose semble être la localisation du complexe des protéines passagères (Klein, Nigg et al. 2006; Vader, Kauw et al. 2006). La phosphorylation de Survivine via Aurora B paraît être importante pour la régulation du complexe, et Survivine est importante pour la liaison d'Aurora B à INCENP (Honda, Korner et al. 2003; Wheatley, Henzing et al. 2004; Delacour-Larose, Thi et al. 2007).

La protéine Boréaline est la protéine passagère découverte le plus récemment (Gassmann, Carvalho et al. 2004). Bien que l'on sache que la Boréaline est phosphorylée pendant la mitose, notamment par Aurora B, on ignore encore la fonction exacte de cette protéine au sein du complexe (Kaur, Stiff et al. 2007; Slattery, Moore et al. 2008).

Les fonctions du complexe des protéines passagères sont multiples. Ce complexe agit essentiellement par phosphorylation via la kinase Aurora B. A chacune des étapes de son trajet, le complexe des protéines passagères interagit avec d'autres complexes, et régule ainsi les différentes étapes de la mitose, et de façon plus globale, leur orchestration.

Ainsi, en prophase, les protéines passagères sont réparties sur les chromosomes. A ce stade, Aurora B phosphoryle à la fois l'histone H3 et les complexes Condensines I responsables

de la condensation des chromosomes (Lipp, Hirota et al. 2007). Le complexe des protéines passagères joue un rôle dans la mise en place du fuseau mitotique ainsi que dans le point de contrôle mitotique. L'inhibition d'Aurora B par la molécule ZM447439 ou la réduction du niveau de la protéine Boréoline par siRNA produit des fuseaux mitotiques anormaux (Gassmann, Carvalho et al. 2004; Wang, Toppari et al. 2006). Aurora B intervient aussi en régulant l'activité et la localisation de la protéine MCAK, ce faisant elle est impliquée dans la réparation des attachements incorrects des microtubules aux kinétochores. Aurora B régule l'activité de HEC1 et permet ainsi le recrutement des protéines du point de contrôle mitotique aux kinétochores et la liaison des microtubules aux kinétochores.

L'activité du complexe des protéines passagères est nécessaire au bon déroulement de la cytokinèse. La protéine kinase Aurora B phosphoryle MgcRacGAP et cette phosphorylation modifie l'activité RacGAP en activité RhoGAP, qui permet l'activation de RhoA et la contraction de l'anneau contractile (Minoshima, Kawashima et al. 2003). La phosphorylation de la Vimentine par Aurora B permet la réorganisation des filaments intermédiaires indispensable à la cytokinèse (Goto, Yasui et al. 2003).

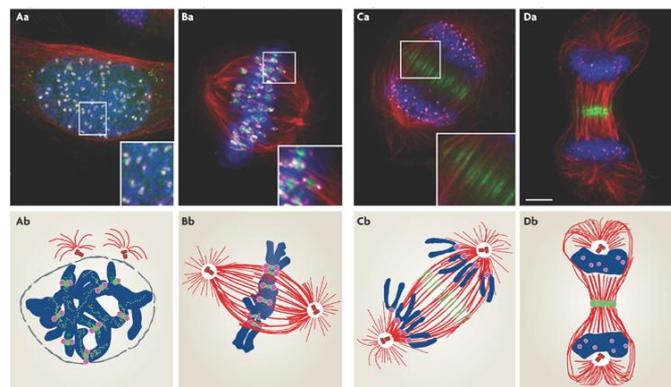


Schéma 14 : Localisation des protéines passagères au cours de la phase M.

Images d'immunofluorescence (images Aa à Da) et schémas correspondants (Ab à Db) présentant la localisation d'Aurora B (en vert) pendant la mitose dans des cellules HeLa. Les centromères sont marqués en rose, la Tubuline- α en rouge et l'ADN en bleu. (A) En prophase, Aurora B est nucléaire et co-localise avec les centromères (Aa, image, Ab, schéma). (B) En métaphase elle se situe aux centromères, au niveau de la face interne des chromosomes. (C) En anaphase, Aurora B se relocalise sur le fuseau central. (D) En télophase Aurora B est située au niveau du corps intermédiaire. D'après (Rieder, Cole et al. 1995; Ruchaud, Carmena et al. 2007).

2.2.2.4 La régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est régulé principalement par des complexes enzymatiques appelés complexes Cycline-Cdk (Morgan 1997; Bloom and Cross 2007). Ces complexes phosphorylent des substrats particuliers responsables d'évènements cellulaires. La régulation de l'activité des Cyclines-Cdk permet l'orchestration de ces évènements et le bon déroulement du cycle cellulaire. Ces complexes sont régulés premièrement par disponibilité des Cyclines, des protéines qui activent les kinases Cdk et ont un rôle dans la spécificité de substrat de ces dernières. Ainsi la régulation transcriptionnelle et la dégradation des Cyclines est un aspect majeur de la régulation du cycle cellulaire. La dégradation par le protéasome des Cyclines dépend de modifications post-traductionnelles spécifiques, des poly-ubiquitinations. Ces modifications sont effectuées par des complexes enzymatiques dit ubiquitines ligases E3, l'APC/C et le SCF, dont l'activité est régulée au court du cycle cellulaire.

2.2.2.4.1 Les complexes Cyclines-CDK

Les complexes Cyclines-Cdk sont des complexes enzymatiques dimériques formés d'une sous unité Cdk (*Cyclin dependant kinase*) et d'une sous unité Cycline (Pines 1992). Les Cdk sont des kinases des résidus sérines et thréonines dont l'activité dépend de la liaison à une Cycline. Les Cdk représentent une famille de protéines de taille homogène, très conservées et dont l'expression au cours du cycle cellulaire est relativement constante. La famille des Cyclines regroupe au contraire des protéines très diverses, de taille variable et dont l'expression et la dégradation sont régulées et varient selon les différentes phases du cycle (Murray 1995; King, Deshaies et al. 1996).

Chez les eucaryotes supérieurs, il existe plusieurs Cdk capables de se lier à diverses cyclines. Une liste non exhaustive des Cdk et de leurs Cyclines associées, ainsi que des fonctions décrites dans la littérature de ces complexes est présentée dans le tableau 3.

Les complexes Cycline-Cdk majeurs responsables des transitions entre les différentes phases du cycle cellulaire chez les eucaryotes supérieurs sont présentés sur le schéma 15.

Cdk	Cycline associée	Pic d'expression de la Cycline	Fonction principale du complexe
Cdk1	Cycline A	S/G2/M	Transition G2/M
	Cycline B1	G2/M	Idem
	Cycline B2	G2/M	Idem
	Cycline B3	G2/M	Idem
Cdk2	Cycline A	S/G2/M	Transition G1/S et phase S
	Cycline B2	G2/M	Transition G2/M
	Cycline E	G1/S	Transition G1/S
Cdk3	Cycline E2		Transition G1/S
Cdk4	Cycline D1	G1	Régulation G1 et transition G1/S
	Cycline D2	G1	Idem
	Cycline D3	Constant	Idem
Cdk5	Cycline G	G2/M	Transition G2/M
Cdk6	Cycline D1	G1	Régulation G1 et transition G1/S
	Cycline D2	G1	Idem
	Cycline D3	Constant	Idem
Cdk7	Cycline H		CAK, kinase activatrice des complexes Cycline-Cdk

Tableau 3 : Principales Cdk impliquées dans le cycle cellulaire et leurs Cyclines associées.

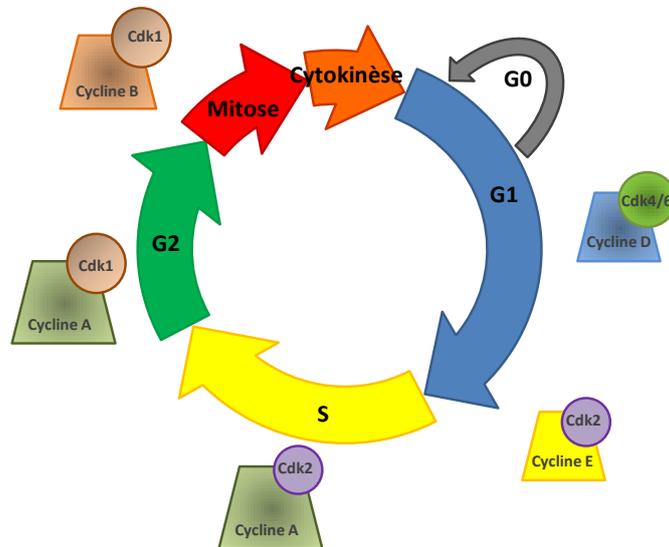


Schéma 15 : principaux complexes Cycline-Cdk impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

L'activation complète du complexe Cycline-Cdk nécessite une phosphorylation via une kinase CAK (pour CDK Activating Kinase) (Fisher and Morgan 1994; Makela, Tassan et al. 1994). CAK est un complexe enzymatique formé de Cdk7, sous-unité catalytique de la famille des Cdk, la Cycline H et de la protéine Mat1. CAK phosphoryle un résidu thréonine situé à l'entrée du site enzymatique du complexe, modifiant ainsi sa structure et augmentant son activité. Il s'agit du résidu thréonine 160 pour la forme humaine de Cdk2, et du résidu thréonine 161 pour la forme humaine de Cdk1.

2.2.2.4.2 Les régulateurs des complexes Cyclines-CDK

Les complexes Cyclines-Cdk sont notamment régulés par phosphorylation et déphosphorylation. Les kinases Wee1 et Myt1 phosphorylent les complexes sur les résidus conservés Tyrosine 15 (Wee1 et Myt1) et Thréonine 14 (Myt1) des Cdk et ces phosphorylations sont inhibitrices (Morgan 1997). Les phosphatases Cdc25 (Cdc25 A, B et C chez l'homme) déphosphorylent ces résidus et lèvent l'inhibition du complexe. Ces régulations post-traductionnelles permettent la modulation de l'activité des complexes au cours d'une même phase et sont déterminantes dans la régulation du complexe Cycline B-Cdk1 et l'entrée en phase M (Karlsson-Rosenthal and Millar 2006).

Les complexes Cycline-Cdk sont aussi régulés par une famille d'inhibiteurs, les CKI (pour *CDK Inhibitor*) (Besson, Dowdy et al. 2008). Ce groupe se partage en deux sous-familles, les protéines produites par le gène INK4 (p15^{INK4}, p16^{INK4}, p18^{INK4} et p19^{INK4}) et la famille des protéines Cip/Kip (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} et p57^{Kip2}). Les membres de la famille INK4 se lient à Cdk4 et Cdk6 et empêchent la liaison à la Cycline D. Les membres de la famille Cip/Kip forment des hétérodimères avec les complexes Cycline-Cdk et inhibent leur activité. Ces inhibiteurs sont particulièrement impliqués dans le déroulement de la phase G1.

2.2.2.5 Cas particulier de la phase G1

La phase G1 est la phase qui précède la phase S où l'ADN est dupliqué. La phase G1 peut être divisée en plusieurs étapes. La première partie de la phase G1 ainsi que la sortie de phase G0 conduisant à la phase G1 permettent l'intégration de signaux prolifératifs internes et externes jusqu'au point de restriction (Planas-Silva and Weinberg 1997). Le point de restriction marque la limite avec la phase G1 dite tardive dans laquelle les cellules qui ont alors amorcé un nouveau cycle cellulaire préparent et régulent la duplication de l'ADN et du centrosome. La traversée de la phase G1 nécessite l'activation d'au moins deux types de complexes Cycline-Cdk : Cycline D-Cdk4/6 et Cycline E-Cdk2. Une description simplifiée de la régulation des Cyclines-Cdk en phase G1 est présentée sur le schéma 16.

Le déroulement de la phase G1 et la régulation des différentes Cyclines-Cdk impliquées sont soumis au contrôle des facteurs de transcription E2F et de la famille des *pocket protéines* qui régule leurs activités (Cobrinik 2005; Dimova and Dyson 2005; Macaluso, Montanari et al. 2006). Chez les mammifères supérieurs, la famille des facteurs de transcription E2F comprend les facteurs E2F1 à E2F7, et la famille des *pocket protéines* comprend les protéines pRb, p130 et p107.

Les trois *pocket* protéines ont la propriété de se lier à des facteurs E2F. Ces liaisons sont inhibées par la phosphorylation des *pockets* protéines par les complexes Cycline E-Cdk2 et Cycline D-Cdk4/6 actifs en phase G1 (Cobrinik 2005). Les protéines p130 et p107 semblent avoir des affinités ou une spécificité pour des facteurs E2F différents de ceux que lie pRb et sont impliqués dans la régulation de gènes différents. pRb est exprimée de façon constante mais son état de phosphorylation varie au cours du cycle, tandis qu'il semblerait que p130 soit exprimée plus fortement dans les cellules arrêtées et p107 plus fortement dans les cellules en prolifération (Classon and Dyson 2001).

La famille des facteurs de croissance E2F est composée de 7 membres qui sont activés par hétérodimérisation avec les protéines DP (DP1 ou DP2), à l'exception de E2F6 et E2F7 (Dimova and Dyson 2005). Les gènes sous le contrôle des facteurs E2F:DP sont multiples. Ils comprennent notamment les protéines Cycline A et Cycline E, Cdk1 et Cdk2 et la phosphatase Cdc25A qui régule notamment l'activité de Cdk2 (DeGregori, Kowalik et al. 1995). Les facteurs E2F activent également la transcription de gènes codant pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN. C'est le cas des protéines Mcm, Orc1, Cdc6 et PCNA qui sont impliquées

dans la formation de complexes aux niveaux des fourches de réplication de l'ADN qui assurent et régulent la duplication de l'ADN au cours du cycle cellulaire (Genovese, Trani et al. 2006). Les facteurs E2F activent aussi la transcription de d'enzymes nécessaires à la synthèse des nouveaux brins d'ADN (ADN Polymerase alpha, Thymidilate kinase, dihydrofolate réductase), ainsi que des protéines nécessaires à la réparation de l'ADN (DNA-PK, Rad51, BRCA1) et des effecteurs des points de contrôles (p53, Chk1) (Ren, Cam et al. 2002). Parmi les facteurs de transcription, E2F1, E2F2 et E2F3a sont de forts activateurs de la transcription qui sont à la fois liés préférentiellement et inhibés par pRb (Trimarchi and Lees 2002). Ils sont faiblement exprimés en phase G0 mais leur expression et leur activité augmentent en milieu de phase G1. Il existe un facteur de transcription E2F3b exprimé lorsque les cellules sont quiescentes et qui forme avec la protéine pRb des complexes répresseurs de la transcription importants pour le maintien des cellules en phase G0 (Aslanian, laquinta et al. 2004). E2F4 et E2F5 sont des facteurs de transcription moins puissants qui sont exprimés de façon constante au cours du cycle. En phase G0 et en début de phase G1 ils sont liés à p130 et p107 et forment alors des complexes répresseurs de la transcription (Dimova and Dyson 2005). Ces complexes se lient aux promoteurs et recrutent des histones déacétylases qui vont modifier la structure de la chromatine et ainsi rendre impossible la transcription de ces gènes. Il ne semble pas que les complexes formés des E2F1-3 et de pRb aient une activité de répresseur de la transcription similaire.

Dans la phase G1 précoce ou bien en phase G0 les cellules sont sous l'inhibition des pocket protéines p130 (chez les cellules quiescentes) et pRb (chez les cellules cyclantes en tout début de phase G1). En l'absence d'activité des complexes Cycline D-Cdk4/6 et CyclineE-Cdk2, les protéines p130, chez les cellules quiescentes, et pRb, chez les cellules en prolifération en phase G1, sont hypophosphorylées. p130 et pRb hypophosphorylées se lient aux complexes formés des facteurs de transcription E2F et de DP1 et les inhibent. Sans activité transcriptionnelle, les cellules ne produisent pas les protéines nécessaires à l'entrée en phase S et à la duplication de l'ADN.

La régulation de Cycline D-Cdk4/6 se fait à plusieurs niveaux. Tout d'abord, l'expression des Cycline D (D1, D2 ou D3 selon les types cellulaires) dépend de signaux mitogéniques. Les signaux mitogéniques stimulant l'expression de Cycline D sont essentiellement des facteurs externes, facteurs de croissance ou bien signaux induits par l'adhésion à la matrice extracellulaire (Sherr 1995; Assoian 1997). En l'absence de signaux mitogéniques continus, la

cycline D qui a une demie-vie très courte est dégradée rapidement. Ces signaux régulent aussi le niveau des protéines CDKI p21^{Cip1} et p27^{Kip1}. p27^{Kip1} est élevé dans le cas d'absence de facteurs de croissance, d'absence d'adhésion à la matrice extracellulaire ou bien en cas d'inhibition de contact (Assoian and Zhu 1997; Bottazzi and Assoian 1997; Bottazzi, Zhu et al. 1999). La stimulation par des facteurs de croissance ou par adhésion à la matrice extracellulaire conduit à son élimination. p21^{Cip1} n'est exprimée que faiblement dans les cellules quiescentes et ne semble pas avoir de rôle dans l'inhibition de contact, néanmoins l'absence d'adhérence à la matrice extracellulaire stimule son expression. La stimulation par des facteurs de croissance stimule aussi son expression mais de façon transitoire (Wu and Schonthal 1997; Bottazzi, Zhu et al. 1999). L'élévation passagère du niveau de p21^{Cip1} permet la stabilisation des complexes Cycline-Cdk et facilite leur assemblage. En l'absence de signaux mitogéniques les niveaux des protéines p21^{Cip1} et p27^{Kip1} sont élevés et les complexes Cyclines-Cdk sont inhibés. Par ailleurs, le facteur de croissance anti-mitotique TGF- β induit la transcription du CDKI p15^{INK4} qui se lie à Cdk4 et Cdk6 et inhibe la formation des complexes Cycline D-Cdk4/6, et parallèlement réprime l'expression de Myc (Sandhu, Garbe et al. 1997; Warner, Blain et al. 1999). La protéine p16^{INK4} est aussi susceptible d'inhiber la formation des complexes Cycline D-Cdk4/6 (McConnell, Gregory et al. 1999).

Le complexe Cycline E-Cdk2 est activé essentiellement par induction de l'expression de la Cycline E par E2F et l'oncogène Myc (Obaya, Mateyak et al. 1999). L'activation du complexe Cycline E-Cdk2 est à l'origine d'une boucle rétro-activatrice. D'une part, l'activation du complexe Cycline E-Cdk2 permet la phosphorylation de pRb, ce qui entraîne l'expression de plus de Cycline E par E2F (Lundberg and Weinberg 1998). D'autre part, le complexe Cycline E-Cdk2 phosphoryle et induit la dégradation de p27^{Kip1} (Sheaff, Groudine et al. 1997; Carrano, Eytan et al. 1999; Montagnoli, Fiore et al. 1999). Cette boucle marque le passage du point de restriction après lequel les cellules sont engagées dans un nouveau cycle cellulaire. L'effet rétro-activateur contribue à augmenter l'activité à la fois du complexe Cycline E-Cdk2 mais aussi des E2F. Passé le point de restriction, les cellules en phase G1 synthétisent un grand nombre de protéines nécessaires à la phase S sous l'effet des E2F activés.

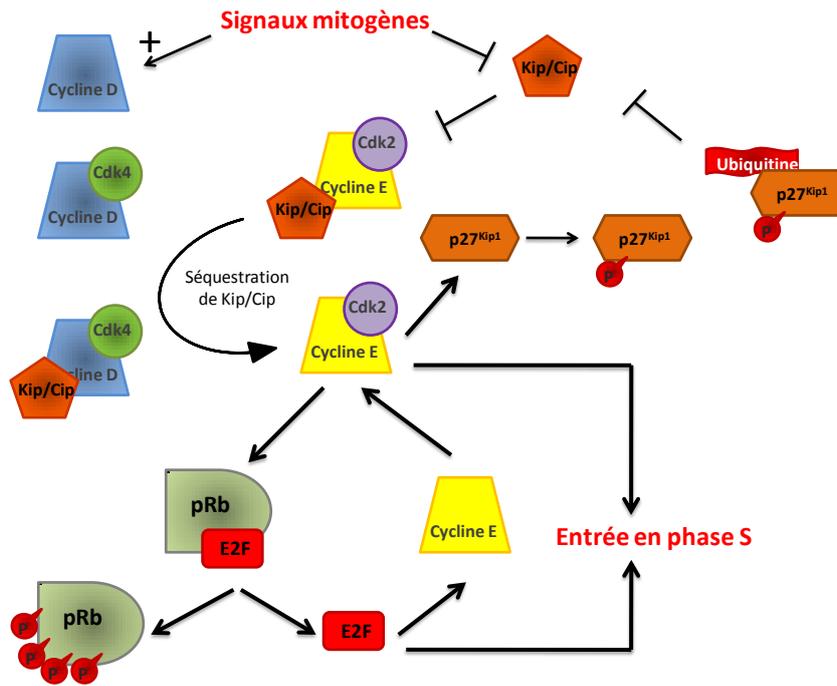


Schéma 16 : Régulation de la transition G1/S.

Les signaux mitogènes induisent l'assemblage de complexes Cycline D-Cdk4/6 associés à une protéine de la famille Kip/Cip. Ces mêmes signaux peuvent moduler l'expression des inhibiteurs Kip/Cip. La séquestration de p21^{Cip1} et p27^{Kip1} par les complexes Cycline D-Cdk4/6 permet de lever l'inhibition du complexe Cycline E-Cdk2. L'activation de Cycline E-cdk2 entraîne la phosphorylation de pRb et la libération des facteurs E2F. Les facteurs E2F induisent l'expression de Cycline E, ce qui entraîne une boucle d'amplification de l'entrée en phase S. Parallèlement, le complexe Cycline E-Cdk2 phosphoryle p27^{Kip1}, ce qui contribue à sa dégradation.

La régulation de la mitose implique essentiellement la régulation de l'activité de la kinase Cdk1 via la regulation du complexe Cycline B-Cdk1. L'activation de ce complexe est nécessaire à l'entrée en mitose puis au maintien des cellules en mitose, tandis que la sortie de mitose dépend de l'inactivation de Cdk1.

2.2.2.6.1 L'entrée en mitose

Pendant la phase G2, la cellule contrôle qu'elle a correctement répliqué son ADN et prépare l'entrée et le bon déroulement de la mitose. Le déclenchement de la mitose dépend de

l'activité du complexe Cycline B-Cdk1 (Nurse 1990). Pendant la phase G2 les Cycline B s'accumulent et s'associent à Cdk1. Les complexes Cycline B-Cdk1 sont néanmoins maintenus inactifs grâce aux phosphorylations inhibitrices des résidus Thréonine14 et Tyrosine 15 sur Cdk1. Ces phosphorylations sont le fait des kinases Wee1 et Myt1 (Russell and Nurse 1987; Parker and Piwnica-Worms 1992; Mueller, Coleman et al. 1995). L'activation rapide des complexes CyclineB-Cdk1 en fin de phase G2 se fait par déphosphorylation de ces sites par un isoforme de la phosphatase Cdc25 : Cdc25C.

Cdc25C est une protéine phosphatase présente mais inhibée au cours du cycle. En phase G2, Cdc25C est phosphorylée sur le résidu Serine 216 (résidu Serine 287 chez le Xénope). Cette phosphorylation entraîne la liaison à la protéine σ 14-3-3 qui inhibe Cdc25C en induisant son export du noyau où elle pourrait être active (Peng, Graves et al. 1997; Dalal, Schweitzer et al. 1999). La liaison σ 14-3-3 /Cdc25C est destabilisée par la phosphorylation de Cdc25C par Cdk2. Chez le Xénope, La protéine phosphatase de type 1 (PP1, dont il existe trois isophormes chez l'homme) déphosphoryle alors la sérine 287 et empêche la liaison avec σ 14-3-3 (Margolis, Walsh et al. 2003). La phosphatase PP2A a aussi été impliquée dans la déphosphorylation de Cdc25 (Margolis, Perry et al. 2006). Cdc25C est activée par phosphorylation par la Polo kinase Plk1, le complexe Cycline B-Cdk1 lui-même et la protéine ERK2, une MAPK (*Mitogen Activated Protein kinase*).

Par ailleurs, la protéine phosphatase Cdc25B a aussi été impliquée dans la régulation de l'entrée en mitose. Cdc25B est phosphorylée au centrosome par la protéine kinase Aurora A en phase G2 (Dutertre, Cazales et al. 2004). En présence de dommages à l'ADN, l'activité de Aurora A est inhibée et Cdc25B n'est pas activée (Cazales, Schmitt et al. 2005).

L'activation du complexe Cycline B-Cdk1 par Cdc25B et Cdc25C conduit à une boucle retro-activatrice. Le complexe Cycline B-CDK1 actif va permettre d'inhiber Wee1, mais aussi d'activer Cdc25C, par phosphorylation (Hoffmann, Clarke et al. 1993). L'activation de Cycline B-Cdk1 entraîne la phosphorylation d'un grand nombre de substrats qui jouent un rôle dans les modifications morphologiques et moléculaires nécessaires au déroulement de la mitose. Ainsi, cette activation permet la phosphorylation de protéines intervenant dans la condensation de la chromatine (Condensines, Histone H1), la dynamique des microtubules et la formation du fuseau

mitotique (MAP, pour *Microtubule Associated Proteins*) ou le désassemblage de la membrane nucléaire (Lamines A, B et C) (Nigg 1992; McNally 1996; Murray 1998).

2.2.2.6.2 La sortie de mitose

Le déroulement de la mitose et la sortie de mitose sont orchestrées essentiellement par le biais de dégradations de protéines clés par le protéasome, notamment de la Cycline B. L'enzyme ubiquitine ligase APC/C marque les protéines cibles destinées à être dégradées. L'ubiquitination de ces substrats est régulée par la liaison de l'APC/C à une sous-unité régulatrice, Cdc20 en début de mitose et Cdh1 en fin de mitose (Acquaviva and Pines 2006; Buschhorn and Peters 2006). Une description simplifiée du rôle et de la régulation de l'APC/C pendant la mitose est présentée dans le schéma 17.

L'APC/C-Cdc20 régule notamment le passage de la métaphase à l'anaphase en contrôlant l'initiation de la séparation des chromatides sœurs des chromosomes. Ce complexe est aussi responsable de l'ubiquitination du complexe Cycline B-Cdk1 et permet de coordonner la sortie de mitose avec la ségrégation des chromosomes. Lors de la transition G2/M, le complexe Cycline B-Cdk1 phosphoryle l'APC/C-Cdc20 et Cdh1. La phosphorylation de Cdc20 est activatrice, tandis que la phosphorylation de Cdh1 est inhibitrice. Jusqu'au déclenchement de la mitose, l'APC/C-Cdc20 serait inhibé par la protéine Emi1, même si ceci a été récemment contesté (Reimann, Freed et al. 2001; Reimann, Gardner et al. 2001; Di Fiore and Pines 2007). La liaison de Cdc20 à Emi1, jusqu'en prophase où Emi1 est dégradée, permet d'inhiber l'APC/C jusqu'à ce que le point de contrôle mitotique se mette en place (Margottin-Goguet, Hsu et al. 2003). Les protéines du point de contrôle mitotique sont activées et se lient à Cdc20 jusqu'à la métaphase (Yu 2007). La levée de l'inhibition de l'APC/C-Cdc20 en métaphase s'accompagne de l'ubiquitination et ensuite de la dégradation de la Sécurine et de la Cycline B, conduisant ainsi à l'inactivation de la kinase Cdk1 (Glotzer, Murray et al. 1991; Hagting, Den Elzen et al. 2002). La Sécurine inhibe la protéine Séparase en se liant à celle-ci. La Séparase est responsable du clivage du complexe Cohésine qui lie les deux chromatides sœurs d'un chromosome. La dégradation de la Sécurine conduit à la séparation des deux chromatides sœurs de chaque chromosome (Uhlmann 2003).

L'inhibition de Cdk1 induit une inhibition progressive de l'activité de l'APC/C-Cdc20, qui n'est plus phosphorylé. L'inhibition de Cdh1 par phosphorylation via Cdk1 est aussi levée. Après la transition métaphase–anaphase, l'activité de l'APC/C-Cdc20 diminue au profit du complexe APC/C-Cdh1 qui devient actif en fin de mitose et en début de phase G1. L'APC/C-Cdh1 est responsable de la dégradation de protéines indispensables à la mitose et permet ainsi la sortie de mitose (Pines 2006). La protéine phosphatase Cdc25C, qui a été activée en fin de phase G2 et est responsable de l'activation du complexe Cycline B-Cdk1, est déphosphorylée et donc désactivée en fin de mitose, ce qui contribue aussi à la sortie de mitose. Il semble que cette inactivation se produise par liaison à σ 14-3-3 et qu'elle soit nécessaire au bon déroulement de la sortie de mitose. La déphosphorylation de Cdc25C est le fait des phosphatases PP2A et Cdc14 (Wolfe and Gould 2004; Forester, Maddox et al. 2007).

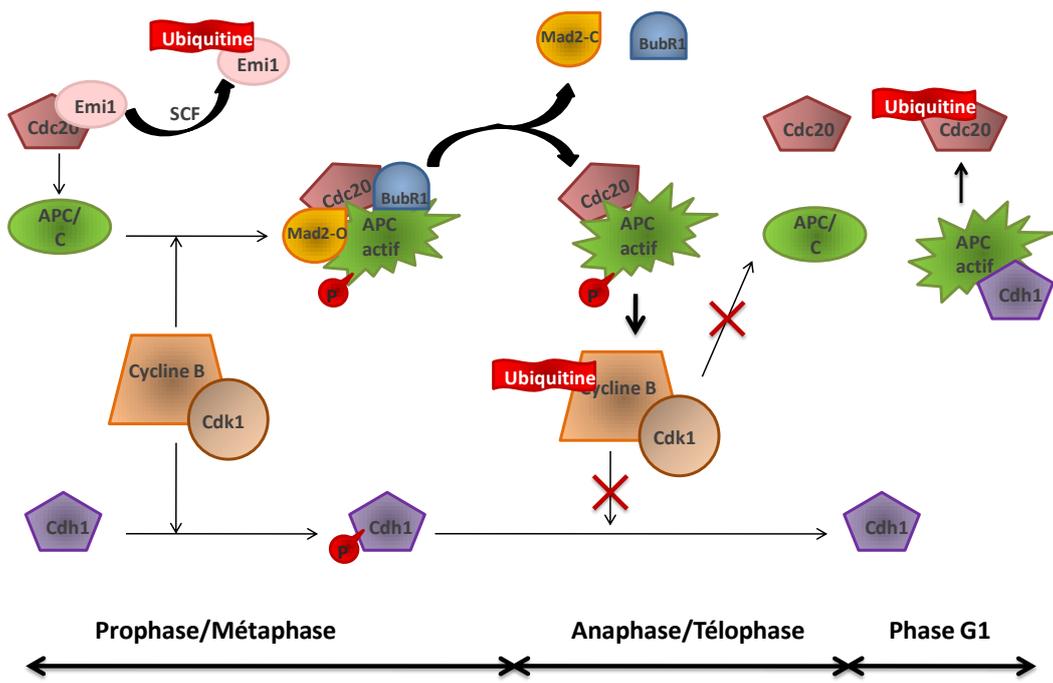


Schéma 17 : Régulation de la sortie de mitose par l'APC/C

L'APC/C est régulé tout au long de la mitose pour permettre une dégradation séquentielle des substrats. En prophase l'APC/C est inhibé par la protéine Emi1. Le complexe Cycline B-Cdk1 phosphoryle Cdh1 et l'inhibe. Le complexe Cycline B-Cdk1 phosphoryle l'APC/C et l'active, mais jusqu'en métaphase l'APC/C est inhibé par les protéines du point de contrôle mitotique. La levée de l'inhibition de l'APC/C marque le passage de la métaphase à l'anaphase. La dégradation de la Cycline B lève l'inhibition de Cdh1 et diminue l'activité de l'APC/C-Cdc20. L'APC/C-Cdh1 ubiquitine Cdc20.

2.2.2.7 Les points de contrôle

2.2.2.7.1 La notion de point de contrôle du cycle cellulaire

La mise en évidence de mécanismes de régulation du cycle cellulaire en cas d'anomalie a permis de définir la notion de point de contrôle (Hartwell and Weinert 1989). Ces mécanismes permettent le ralentissement ou l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la mise en place de processus de réparation ou, à défaut, d'apoptose. Le point de contrôle est organisé autour d'un détecteur, molécule sensible aux anomalies, un messenger, généralement une protéine kinase ou une molécule ayant fonction d'adaptateur, et un effecteur, responsable de la modification du cycle cellulaire et des processus mis en œuvre pour la réparation ou l'apoptose.

2.2.2.7.2 Le point de contrôle de l'antéphase.

Un ensemble de publications récentes font état d'un nouveau point de contrôle, encore assez mal défini. L'idée de ce point de contrôle a pour origine une publication montrant que les cellules, lorsqu'elles sont traitées avec du nocodazole observent un délai d'entrée en métaphase (Scolnick and Halazonetis 2000). Les auteurs ont aussi montré que ce délai était dû à la protéine Chfr, une protéine dont l'expression est modifiée dans un grand nombre de lignées tumorales. Plus tard, il a été montré que Chfr est une ubiquitine ligase qui régule la dégradation de la protéine Plk1, retardant ainsi l'activation de Cdk1 par Cdc25 et bloquant l'entrée en mitose (Kang, Chen et al. 2002). D'autres auteurs ont rapproché ce mécanisme de la réponse des cellules à différents types de stress en phase G2 (Mikhailov and Rieder 2002). Certains proposent que la protéine Chfr et la protéine kinase p38MAPK collaborent en phase G2 dans un mécanisme de contrôle qui répond aux stress de façon générale (Matsusaka and Pines 2004; Mikhailov, Shinohara et al. 2005).

2.2.2.7.3 Le point de contrôle du fuseau mitotique

Les cellules régulent la ségrégation de leurs chromosomes lors de la mitose via le point de contrôle mitotique (Musacchio and Salmon 2007). Ce point de contrôle, permet de différer le passage d'une phase du cycle à la suivante jusqu'à ce que les conditions requises soient présentes. Il régule le passage de la métaphase à l'anaphase et détecte les anomalies liées à un fuseau de microtubules anormal. Le point de contrôle mitotique agit sur le cycle cellulaire en inhibant Cdc20 et l'ubiquitination de la Cycline B et de la Sécurine par l'APC/C.

Les premières protéines du point de contrôle mitotique ont été découvertes lors d'un crible qui a permis d'identifier des gènes impliqués dans l'arrêt en métaphase en présence d'inhibiteurs des microtubules chez la levure (Hoyt, Totis et al. 1991; Li and Murray 1991). Ces travaux ont mis en évidence deux familles de gènes, MAD (pour *Mitotic Arrest Deficient*) et BUB (pour *Budding Uninhibited by Benzimidazole*), qui sont conservées chez tous les eucaryotes. Chez l'homme, les protéines de ces deux familles impliquées dans le point de contrôle mitotique sont Bub1, BubR1, Bub3, Mad1 et Mad2.

Un complexe a été décrit qui regroupe les protéines Mad2, BubR1 et Bub3 ainsi que Cdc20 et qui semble être l'effecteur du point de contrôle mitotique (Sudakin, Chan et al. 2001). Ce complexe se lie à l'APC/C et inhibe son activité ubiquitine ligase (Fang, Yu et al. 1998). Les protéines Mad1 et Bub1 collaborent avec d'autres protéines pour l'amplification du signal du point de contrôle (De Antoni, Pearson et al. 2005; Morrow, Tighe et al. 2005). En prométaphase les protéines du point de contrôle mitotique se localisent au niveau des kinétochores (Howell, Hoffman et al. 2000; De Antoni, Pearson et al. 2005). Cette localisation nécessite l'intégrité des kinétochores. Ainsi le complexe Rod-Zw10-Zwilch, MPS1 et les protéines qui participent à l'architecture des kinétochores (discutés plus haut) sont indispensables au bon fonctionnement du point de contrôle (Buffin, Lefebvre et al. 2005).

Mad2 et BubR1 sont activées au niveau des kinétochores jusqu'à ce que les chromosomes soient alignés sur la plaque métaphasique et que tous les kinétochores soient attachés à des microtubules suffisamment dynamiques (Chen, Waters et al. 1996). Mad2 et BubR1 activés se lient au complexe ubiquitine ligase APC/C-cdc20 et l'inhibent. Le point de contrôle semble répondre à deux défauts : le manque d'attachement des microtubules aux kinétochores, et le manque de tension aux kinétochores lorsque les microtubules ne sont pas assez dynamiques (Rieder, Schultz et al. 1994; Nicklas, Ward et al. 1995; Rieder, Cole et al. 1995).

Les protéines Mad2 et BubR1 répondraient différemment à ces deux conditions, Mad2 permettant l'inhibition de Cdc20 pour les problèmes d'attachement et BubR1 pour les problèmes de tension (Waters, Chen et al. 1998; Skoufias, Andreassen et al. 2001). Mad2 est recruté sur les kinétochores non attachés via Mad1 et la liaison à Mad1 modifie sa conformation de Mad2-O (*Mad2-Open*, la forme inactive) en Mad2-C (*Mad2-Closed*, la forme activée) (Chen, Shevchenko et al. 1998; De Antoni, Pearson et al. 2005). Mad2-C se lie préférentiellement à Cdc20 et l'inhibe (Yu 2006). Le recrutement de Mad1 et Mad2 dépend du complexe Rod-Zw10-Zwilch qui est éliminé des kinétochores après attachement des microtubules (Karess 2005). BubR1 est activée par CENP-E en l'absence d'attachement des microtubules, et désactivé par la même protéine lorsque les microtubules se lient aux kinétochores (Mao, Abrieu et al. 2003; Mao, Desai et al. 2005). La Dynéine joue un rôle important dans l'inhibition du point de contrôle mitotique en transportant les molécules du point de contrôle des kinétochores vers les pôles du fuseau mitotique (Musacchio and Salmon 2007).

Parrallèlement, la protéine Aurora B, et donc le complexe des protéines passagères auquel elle appartient, se localise aussi aux kinétochores jusqu'à la transition métaphase/anaphase. Aurora B a été impliquée dans la régulation indirecte du point de contrôle mitotique en réponse aux anomalies d'attachement des microtubules aux kinétochores. Aurora B est plus concentrée sur les kinétochores des chromosomes mérotéliques où elle active la Kinésine MCAK (Lan, Zhang et al. 2004; Knowlton, Lan et al. 2006). MCAK est une Kinésine qui a la propriété de dépolymériser les microtubules. Les kinétochores mérotéliques qui étaient attachés de façon anormale se retrouve libérés des microtubules, ce qui active le point de contrôle mitotique sur ces sites via recrutement de Mad2 et BubR1 (Ditchfield, Johnson et al. 2003; Kline-Smith, Khodjakov et al. 2004).

2.2.2.7.4 Points de contrôle détectant l'endommagement de l'ADN

Les cellules sont aussi sensibles aux erreurs de réplication de l'ADN ainsi qu'aux dommages à l'ADN impliquant des coupures simple ou double brin. Les points de contrôles relatifs au métabolisme de l'ADN font intervenir une famille de protéines kinases, les kinases dépendantes des phosphatidyl-inositols (ou *PI3K-related kinases*) qui interviennent à la transition G1/S et à la transition G2/M. Cette famille comprend les protéines ATM (*Ataxia-*

Telangiectasia Mutated), ATR (*Ataxia-Telangiectasia like and Rad3 homolog*) et DNA-PK (*DNA-dependant Protein Kinase*) (Durocher and Jackson 2001). Il semble exister deux voies parallèles dans les cellules de mammifères : la voie ATR activée principalement par des anomalies des fourches de réplication et des cassures simple brin de l'ADN, et la voie ATM activée principalement par des cassures double brin de l'ADN. Ces deux voies agissent sur le cycle cellulaire en stabilisant la protéine suppresseur de tumeur p53, dont les propriétés de facteur de transcription induisent une surexpression de l'inhibiteur des Cycline-Cdk p21^{Cip1} responsable de l'arrêt du cycle cellulaire.

Les kinases ATM et ATR, régulent des protéines clés effectrices de la surveillance cellulaire telles que p53, Mdm2, le complexe Cohésine, et les kinases Chk1 et Chk2 (Iliakis, Wang et al. 2003). Chk2 est principalement activée par ATM, alors que Chk1 est principalement activée par ATR. Chk1 et Chk2 ont des substrats communs (p53, Cdc25 et BRCA1), et pourraient donc posséder des fonctions partiellement redondantes destinées à assurer la solidité du point de surveillance du cycle cellulaire (Durocher and Jackson 2001). Chk2 semble jouer un rôle majeur en permettant la persistance de l'arrêt en G2, alors que Chk1 semble plus spécifiquement impliquée dans l'induction de l'arrêt en G2.

Deux mécanismes agissent sur le point de contrôle G1/S. L'un est rapide, et implique une cascade de kinases dont l'activation conduit à la dégradation, et donc à l'inactivation, de la phosphatase Cdc25A. Cela empêche l'activation des complexes Cycline D-Cdk4/6 et Cycline E/A-Cdk2. L'autre mécanisme est plus lent, car il implique l'activation de la protéine p53 et nécessite que soient exprimés les gènes activés par p53 (Levine 1997). Dans des conditions normales, p53 a une demi-vie très courte. Sa phosphorylation sur la Sérine 15 par les kinases ATM et ATR, et sur la Sérine 20 par les kinases Chk2, Chk1 et Plk3, réduit la liaison de Mdm2, ce qui diminue son ubiquitinylation (sous le contrôle de Mdm2) et empêche ainsi sa dégradation dans le protéasome (Xie, Wu et al. 2001). La stabilisation de p53 induit l'expression de p21^{Cip1} qui s'accompagne de l'arrêt du cycle cellulaire. La protéine p14^{ARF} est le produit d'un gène suppresseur de tumeurs (*ARF*) qui inactive Mdm2 en induisant sa translocation vers le nucléole, inhibe son activité ubiquitine ligase et augmente la stabilisation de p53 (Midgley, Desterro et al. 2000).

Le point de contrôle en G2/M fait aussi intervenir une réponse rapide et une réponse lente. Les kinases Chk1 et Chk2 jouent un rôle prédominant dans la réponse rapide, en phosphorylant Cdc25C sur la sérine 216 (Peng, Graves et al. 1997). Cette phosphorylation crée un site d'attachement pour la protéine σ 14-3-3, ce qui entraîne la séquestration de Cdc25C dans le cytoplasme, à distance de son substrat nucléaire, Cdk1 (Chan, Hermeking et al. 1999). Récemment, une nouvelle kinase de la famille des Polo kinases, Plk3, a été identifiée comme ayant les mêmes effets que Chk1 et Chk2 (Bahassi el, Conn et al. 2002). Les lésions de l'ADN peuvent également inactiver Cdc25C en inhibant l'action de la Polo kinase Plk1, nécessaire à son activation (Tsvetkov and Stern 2005). L'inactivation de Cdk1 par les lésions de l'ADN peut aussi s'exercer *via* une hyperphosphorylation de son résidu Tyr15, par activation de Wee1 (Stanford and Ruderman 2005). La protéine p53 joue un rôle dans la persistance de l'arrêt en bloquant l'activité du complexe kinase Cycline B-Cdk1. L'induction de p21^{Cip1} par p53 inhibe directement la kinase Cdk1, mais bloque également CAK, qui normalement active Cdk1. L'induction de Gadd45 bloque elle aussi l'activité de la kinase Cdk1 (Taylor and Stark 2001).

2.2.3 La mort cellulaire programmée

La mort cellulaire programmée, dont l'apoptose est une des voies la plus connue et la mieux étudiée, est essentielle à la régulation homéostatique des tissus dans les organismes (Blank and Shiloh 2007). On distingue plusieurs types de mort cellulaire programmée selon si les mécanismes mis en jeu soit dans l'induction soit dans la réponse des cellules sont apoptotiques et impliquent l'activation de protéines appelées Caspases. Un cas particulier de mort cellulaire programmée non apoptotique est directement liée au cycle cellulaire et aux points de contrôle, il s'agit de la « mort cellulaire mitotique » ou MCD (pour *Mitotic Cell Death*), ou « catastrophe mitotique ». Le MCD a été observé et décrit dans la littérature comme étant le résultat de mitose anormale (Sato, Mizumoto et al. 2000). Bien que l'on connaisse mal les particularités biochimiques de ce programme de mort cellulaire, le MCD se décrit morphologiquement par la présence de micronoyaux, c'est-à-dire de plusieurs noyaux de tailles différentes. Le MCD a été observé notamment après l'utilisation de traitements causant des dommages à l'ADN, et représente une des formes majeures de mort cellulaire dans les tumeurs par traitements de

chimiothérapie (Roninson, Broude et al. 2001). Ce phénomène est particulièrement important dans le cas de cellules dont les mécanismes de contrôle des phases G1 et G2, ainsi que le point de contrôle mitotique, sont altérés (Chan, Hwang et al. 2000).

Plusieurs mécanismes d'induction du MCD ont été proposés. Le premier modèle suggère que la formation de cellules multinuclées aurait pour cause l'établissement de fuseaux mitotiques multipolaires. Ces fuseaux multipolaires pourraient avoir pour cause soit un nombre anormal de centrosomes dû à une anomalie de leur duplication ou de divisions précédentes, soit des anomalies de la mise en place du fuseau mitotique dues à des mutations des protéines régulatrices.

Le deuxième modèle suggère une entrée en mitose précoce due à des défauts dans le contrôle de la phase G2 et notamment le point de contrôle lié aux dommages à l'ADN dans cette phase. Les cellules entrent alors en mitose tandis que leur ADN n'est pas correctement condensé, et ces anomalies cumulées à un point de contrôle mitotique altéré ou des fuseaux mitotiques multipolaires conduisent à la formation de micronoyaux.

2.2.4 La sénescence

Il existe deux types de sénescence, la sénescence répllicative et la sénescence cellulaire précoce autrement appelée STATIS. Les cellules sénescents sont des cellules arrêtées et qui ne se divisent pas même après stimulation via des facteurs mitogéniques et dont les activités métaboliques et transcriptionnelles sont réduites mais toujours existantes. La sénescence s'accompagne de modifications morphologiques, les cellules présentant une forme plus large et aplatie que les cellules normales. Les phénotypes des deux types de sénescence sont biochimiquement similaires et s'accompagnent de modifications métaboliques, notamment une induction de l'activité β -galactosidase qui reflèterait un accroissement de la masse lysosomale dans les cellules sénescents.

La sénescence répllicative est un arrêt permanent du cycle cellulaire causé par l'accumulation des divisions cellulaires que l'on observe dans les cellules normales à la capacité

de prolifération limitée (Hayflick 2003). La sénescence pécoce se produit de façon prématurée dans des cellules qui ont été soumises à un stress important (Roninson, Broude et al. 2001; Roninson 2003).

La sénescence réplivative est induite par le raccourcissement irréversible des télomères qui se produit à chaque division cellulaire. Au cours de la division cellulaire, des motifs répétés sont perdus en raison de l'incapacité du système de réplication de répliquer les extrémités linéaires des chromosomes. Cette perte d'ADN est compensée par l'activité d'une transcriptase inverse, la Télomérase, présente dans les cellules germinales et les cellules souches mais absente dans les cellules somatiques (Harley, Futcher et al. 1990; Bodnar, Ouellette et al. 1998). En l'absence d'activité Télomérase suffisante la longueur des télomères diminue avec les divisions cellulaires. Le raccourcissement des télomères au dessous d'une taille minimale crée une perturbation de la structure du télomère à l'origine de la sénescence. Cette perturbation serait reconnue par la cellule comme un dommage de l'ADN (Wright and Shay 2001; Karlseder, Smogorzewska et al. 2002).

La sénescence précoce est induite dans certaine lignées cellulaires et dans les cellules normales après plusieurs types de signaux de stress, comme les dommages causés à L'ADN, le stress oxydatif et l'expression de l'oncogène Ras activé (Serrano, Lin et al. 1997; Zhu, Woods et al. 1998; Mallette, Gaumont-Leclerc et al. 2007).

Ces deux types de sénescence mettent en œuvre des processus moléculaires de contrôle du cycle cellulaire similaires. Le programme effecteur de la sénescence comprend les voies p53/p21^{Cip1} et p16^{INK4}/pRb. En effet, dans les deux types de sénescence on observe une induction de la transcription du gène INK4 codant pour la protéine p16^{INK4}, ainsi qu'une activation de la protéine p53 conduisant à la surexpression de p21^{Cip1} (Serrano, Lin et al. 1997). La surexpression p16^{INK4} et p21^{Cip1} conduit à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. L'expression de Ras activé induit l'activation par phosphorylation des facteurs de transcription (Groth, Weber et al. 2000) Ets1 et Ets2 qui augmentent la transcription du gène INK4 (Huot, Rowe et al. 2002). Parallèlement Ras activé induit l'expression de p19^{ARF} qui permet la stabilisation de p53. Dans le cas de la sénescence réplivative, Ets1 augmente selon un processus qui n'implique pas l'activation de la voie Ras/Raf/MEK, tandis que p53 serait activée par une

signalisation similaire à celle mise en œuvre lors de dommages à l'ADN et qui implique la protéine kinase ATM (Ohtani, Zebedee et al. 2001; Zheng, Wang et al. 2004).

2.3 Anomalies chromosomiques et cancérogenèse

2.3.1 Définitions

La ploïdie d'une cellule est le nombre de d'exemplaires de chromosomes qu'elle contient. Elle est une constante symbolisée par la lettre N et dépend de l'espèce. Une cellule est dite euploïde si elle contient un multiple entier de N chromosomes et aneuploïde dans le cas contraire. Chez les mammifères, les cellules somatiques sont diploïdes et contiennent donc 2N chromosomes, tandis que les gamètes sont haploïdes et contiennent N chromosomes. Dans le cas particulier de cellules contenant plus de 2 sets entiers de chromosomes on parle de polyploïdie.

Chez l'homme, l'aneuploïdie est toujours associée à une pathologie. Il peut s'agir du cas d'un chromosome surnuméraire (syndrome de Down) ou manquant (syndrome de Turner) dû à un défaut pendant la gamétogénèse entraînant après la fécondation la reproduction de cette anomalie dans chaque cellule de l'organisme. L'aneuploïdie est un des signes associés aux tumeurs malignes. Le taux d'aneuploïdie évolue avec la gravité du diagnostic, les tumeurs les plus agressives présentant un grand nombre d'anomalies du caryotype.

L'instabilité génomique est la propriété pour une cellule, un tissu ou une tumeur, d'accumuler des modifications du génome rapidement. Ces modifications regroupent les mutations génétiques, les recombinaisons chromosomiques, défaut de ploïdie ou toute autre modification du génome. Plus que la présence de mutations elles-mêmes, c'est la capacité à les multiplier au cours du temps qui est désignée par ce terme, l'instabilité génomique définissant un phénotype et non un mécanisme. Les différentes formes d'instabilité génomiques sont regroupées en sous catégories, dont les plus communes sont les phénotypes CIN (*Chromosomal INstability*) et MIN (*Microsatellite INstability*).

L'instabilité chromosomique ou CIN est la propriété pour une cellule ou un groupe de cellules d'accumuler relativement rapidement des défauts de ploïdie qui se caractérisent par la perte ou le gain de chromosomes entiers ou tronqués. L'instabilité chromosomique est donc le taux de variation du caryotype dans le temps par rapport à une cellule ou un tissu normal. L'instabilité des microsatellites est la propriété pour une cellule ou un groupe de cellules d'accumuler relativement rapidement des mutations génétiques, principalement dans les séquences courtes répétées.

Les tumeurs présentent en grande majorité des phénotypes d'instabilité génomiques (Lengauer, Kinzler et al. 1998). L'instabilité de type MIN représente environ 15% des cancers colorectaux. L'instabilité de type CIN est la forme la plus commune d'instabilité génomique, on la retrouve dans 80% à 85% des cancers colorectaux.

2.3.2 Origine

Les mécanismes moléculaires à l'origine de l'instabilité génomique sont encore mal connus. Néanmoins l'instabilité des microsatellites (MIN) a été corrélée avec des mutations dans les gènes de protéines impliquées dans les réparations des erreurs de réplication de l'ADN (*mismatch repair*).

Plusieurs mécanismes expliquant l'origine de l'instabilité chromosomique ont été proposés (Lengauer, Kinzler et al. 1998; Duesberg, Rasnick et al. 1999). Les mécanismes responsables de la ségrégation des chromosomes pourraient être impliqués dans l'instabilité chromosomique en facilitant la formation de cellules aneuploïdes. Un certain nombre de mutations concernant soit directement les protéines du point de contrôle mitotique soit des protéines impliquées dans des voies de signalisation associées ont été retrouvées dans plusieurs type de cancers (Jallepalli, Waizenegger et al. 2001; Saeki, Tamura et al. 2002; Wang, Cummins et al. 2004). De plus, le cas de souris transgéniques hétérozigotes (+/-) pour une délétion de certaines protéines liées au point de contrôle mitotique a mis en évidence un rôle éventuel bien que conditionnel dans l'instabilité chromosomique (Weaver, Bonday et al. 2003; Weaver, Silk et al. 2007). De la même façon, la surexpression de Mad2, une des protéines du point de contrôle

mitotique, induit à la fois aneuploïdie et cancérogénèse chez la souris (Sotillo, Hernando et al. 2007). Cependant on peut noter que si les mutations des gènes impliqués dans le point de contrôle mitotique sont retrouvées dans les cas d'instabilité chromosomique, cela représente une faible proportion des tumeurs observées. De plus, les cancers colorectaux aneuploïdes semblent posséder un point de contrôle mitotique compétent (Cahill, Lengauer et al. 1998; Tighe, Johnson et al. 2001).

2.3.3 Rôle dans la cancérogénèse

Malgré l'association fréquente retrouvée entre l'instabilité chromosomique, l'aneuploïdie et le processus de cancérogénèse, une relation de causalité n'a pourtant pas été mise en évidence. En effet, certains cancers colorectaux ne présentent aucune des instabilités connues, et il n'a pas encore été démontré que l'instabilité génomique est réellement nécessaire à l'initiation ou au développement des tumeurs. De même, le rôle de l'aneuploïdie dans la cancérogénèse n'est pas éclairci.

Dans les cancers du colon présentant un phénotype d'instabilité chromosomique, le taux de perte ou de gain de chromosome par division est jusqu'à 100 fois plus important que dans les tumeurs du même type dont le caryotype est stable (Lengauer, Kinzler et al. 1997). On retrouve une hétérogénéité dans le nombre de chromosomes par cellules au sein d'une même tumeur, ce qui indique que l'instabilité chromosomique se produit au cours du développement de la tumeur (Furuya, Uchiyama et al. 2000). Pourtant, les études de l'influence de ces modifications sur le métabolisme cellulaire sont en contradiction avec l'hypothèse que l'aneuploïdie génère l'instabilité chromosomique. Une analyse du métabolisme des cellules aneuploïdes chez la levure a montré que l'aneuploïdie est un inconvénient de sélection et rend les cellules globalement plus sensibles à leur environnement (Torres, Sokolsky et al. 2007).

La question de savoir si l'aneuploïdie est une cause ou une conséquence de la cancérogénèse reste posée. Ainsi les patients souffrant du syndrome de Down présentent un risque de leucémie accrue mais un risque de tumeur solide inférieur à la moyenne. Néanmoins le faible taux de tumeurs solides chez ces patients semble être dû à la présence d'un allèle

supplémentaire (située sur le chromosome 21 surnuméraire dans ce syndrome) du gène codant pour Ets2, un facteur de transcription impliqué dans la régulation du cycle cellulaire. L'aneuploïdie en mosaïque n'est pas une maladie chromosomique mais une prédisposition à la non disjonction des chromosomes pendant la division cellulaire qui induit un taux élevé de cellules aneuploïdes, où de multiples chromosomes et tissus peuvent être touchés chez le même individu. L'aneuploïdie en mosaïque est un syndrome qui aurait pour origine des mutations dans les gènes de surveillance de la stabilité du génome, notamment le gène de la protéine BubR1, impliquée dans la régulation de la ségrégation des chromosomes pendant la division cellulaire. Les patients atteints de ce syndrome présentent un taux plus élevé que la moyenne de tumeurs.

3 Objectifs des travaux de thèse

Le cycle cellulaire est le processus universel par lequel les cellules eucaryotes prolifèrent. De nombreux mécanismes régulent chacune des étapes de ce cycle et assurent la division d'une cellule mère en deux cellules filles identiques. Ces mécanismes et points de contrôle sont fréquemment mutés dans les tumeurs et la perte du contrôle de la prolifération constitue la problématique centrale de l'oncogénèse. Le cytosquelette de microtubules et le centrosome, qui permet son organisation, sont déterminants pour la division cellulaire, du fait de leur rôle critique dans la ségrégation des chromosomes en mitose.

Les travaux présentés dans ce manuscrit portent sur l'étude du rôle du cytosquelette de microtubules et du centrosome dans la division cellulaire et dans la réponse cellulaire post-mitotique. Ils représentent le travail effectué lors d'une collaboration avec le laboratoire de Steve Doxsey ainsi que le travail effectué sous la direction de Robert Margolis. Dans ces travaux, je me suis intéressée au déroulement de la mitose et aux conséquences de la perturbation des éléments du cytosquelette sur le déroulement de la mitose et le cycle cellulaire.

La collaboration avec Steve Doxsey avait pour objet l'étude du rôle de la protéine Péricentrine en cytokinèse. Ces travaux ne nous ont pas permis de mettre en évidence un quelconque rôle pour Péricentrine dans les événements tardifs de la phase M. Lors de mes recherches, j'ai cependant participé à montrer comment la protéine Centrioline joue un rôle dans le clivage des deux cellules filles en fin de phase M. La publication de ce travail ainsi que ma contribution est décrite dans la première partie des résultats et discussion.

Par ailleurs, j'ai étudié la prolifération des cellules aneuploïdes. J'ai montré que des cellules primaires de mammifères deviennent aneuploïdes dans certaines conditions d'utilisation des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules. J'ai ensuite montré que ces cellules anormales cessent de proliférer et deviennent sénescents. J'ai mis en évidence que cet arrêt est contourné dans les cellules transformées. Le compte rendu de ces travaux ainsi que la conclusion et la discussion de ce sujet sont présentés dans la deuxième partie du chapitre des résultats et discussion.

Résultats et discussion

Première partie

Rôle d'une protéine du centrosome dans les évènements finaux de la phase M

4 Résultats et discussion I : Rôle d'une protéine du centrosome dans les évènements finaux de la phase M

4.1 Introduction au sujet

Le centrosome joue un rôle dans la mise en place et la régulation du fuseau mitotique pendant la phase M. Plusieurs publications ont souligné un rôle supplémentaire potentiel dans le déroulement de la phase M. D'une part, il a été rapporté que le centriole père se déplace jusqu'au corps intermédiaire en fin de cytokinèse, et que ce mouvement précède le clivage de la membrane (Piel, Nordberg et al. 2001). D'autre part, un certain nombre de protéines centrosomales, dont la protéine Centrioline, ont été impliquées dans les évènements finaux de la phase M (Gromley, Jurczyk et al. 2003). Leurs rôles exacts dans ces évènements et leur mode d'action n'ont pourtant pas été éclaircis.

La protéine Centrioline est une protéine centrosomale de 270 kDa qui se localise sur le centriole père, au niveau des appendices sub-distaux. Lorsque le niveau de Centrioline est diminué par RNA interférants (*siRNA*), la proportion de cellules en fin de télophase augmente, ainsi que le nombre de cellules bi-nuclées. Ces défauts semblent indiquer un rôle pour Centrioline dans la cytokinèse (Gromley, Jurczyk et al. 2003).

Relativement peu de choses sont connues sur les mécanismes permettant le clivage des deux cellules filles en fin de phase M. Bien que l'on sache que la cytokinèse nécessite un réarrangement de la membrane plasmique au site de clivage afin de préserver l'intégrité des deux cellules filles, on ignore quels sont les intervenants potentiels. La membrane plasmique au niveau de l'anneau contractile est enrichie en lipides particuliers, les phosphatidyl-Inositols ($\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$) et le cholestérol (Desautels, Den Haese et al. 2001; Field, Madson et al. 2005). Cet enrichissement laisse penser qu'il existe un remodelage de la membrane pendant la mitose, et peut-être un trafic de vésicules dirigé vers le corps intermédiaire.

Chez la levure bourgeonnante, un complexe protéique appelé exocyst se localise sur la membrane au niveau du site de clivage (TerBush and Novick 1995). L'exocyst est formé de plusieurs protéines (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 and Exo84), et a été impliqué dans la cytokinèse chez la levure et dans des processus de fusion de membrane chez d'autres organismes, dont l'homme (Hsu, Hazuka et al. 1999). Le rôle de l'exocyste serait de permettre la fusion de vésicules à des endroits spécifiques de la membrane plasmique. La fusion membranaire nécessite aussi l'action des protéines SNAREs qui ont pour rôle de favoriser le rapprochement entre les vésicules et la membrane plasmique. On distingue les v-SNAREs qui se lient à la membrane des vésicules, et les t-SNAREs qui sont liés aux membranes des compartiments cibles (Prekeris and Gould 2008).

4.2 Article

Centriolin Anchoring of Exocyst and SNARE Complexes at the Midbody Is Required for Secretory-Vesicle-Mediated Abcission . Cell , Volume 123 , Issue 1 , Pages 75 - 87 A . Gromley , C . Yeaman , J . Rosa , S . Redick , C . Chen , [S . Mirabelle](#) , M . Guha , J . Sillibourne , S . Doxey

J'ai contribué en partie à ce travail par mon étude de la localisation de différentes protéines au niveau du corps intermédiaire. J'ai pu observer une redistribution de la Tubuline- γ vers le corps intermédiaire et vers les extrémités (-) des microtubules du fuseau central au cours de la cytokinèse. J'ai aussi contribué à caractériser la localisation de Centrioline par rapport au corps intermédiaire. Cette contribution est illustrée dans la figure 1.

Centriolin Anchoring of Exocyst and SNARE Complexes at the Midbody Is Required for Secretory-Vesicle-Mediated Abscission

Adam Gromley,^{1,3} Charles Yeaman,² Jack Rosa,¹
Sambra Redick,¹ Chun-Ting Chen,¹
Stephanie Mirabelle,¹ Minakshi Guha,¹
James Sillibourne,¹ and Stephen J. Doxsey^{1,*}

¹Program in Molecular Medicine
University of Massachusetts Medical Center
Worcester, Massachusetts 01605

²Department of Anatomy and Cell Biology
University of Iowa
Iowa City, Iowa 52242

Summary

The terminal step in cytokinesis, called abscission, requires resolution of the membrane connection between two prospective daughter cells. Our previous studies demonstrated that the coiled-coil protein centriolin localized to the midbody during cytokinesis and was required for abscission. Here we show that centriolin interacts with proteins of vesicle-targeting exocyst complexes and vesicle-fusion SNARE complexes. These complexes require centriolin for localization to a unique midbody-ring structure, and disruption of either complex inhibits abscission. Exocyst disruption induces accumulation of v-SNARE-containing vesicles at the midbody ring. In control cells, these v-SNARE vesicles colocalize with a GFP-tagged secreted polypeptide. The vesicles move to the midbody ring asymmetrically from one prospective daughter cell; the GFP signal is rapidly lost, suggesting membrane fusion; and subsequently the cell cleaves at the site of vesicle delivery/fusion. We propose that centriolin anchors protein complexes required for vesicle targeting and fusion and integrates membrane-vesicle fusion with abscission.

Introduction

Cytokinesis is a fundamental process that results in division of a single cell with replicated DNA into two daughters with identical genomic composition (see Glotzer, 2001, 2005; Guertin et al., 2002). Early events in animal cell cytokinesis include assembly and contraction of the actomyosin ring to form the cleavage furrow. Continued furrowing results in constriction of the plasma membrane to form a narrow cytoplasmic bridge between the two nascent daughter cells. Within this intercellular bridge are bundled microtubules and a multitude of proteins that together form the midbody. In a poorly understood final step called abscission, the

cell cleaves at the intercellular bridge to form two daughter cells.

Membrane trafficking is required for late stages of cytokinesis (Albertson et al., 2005; Finger and White, 2002; Jurgens, 2005; Papoulas et al., 2004; Strickland and Burgess, 2004). In *C. elegans* embryos, inhibition of Golgi secretion by brefeldin A (BFA) resulted in late-stage cytokinesis defects (Skop et al., 2001). More recent studies in mammalian cells using dominant-negative approaches showed that the membrane-fusion-inducing SNARE components, syntaxin-2 and endobrevin/VAMP8, are required for a final step in cell cleavage (Low et al., 2003). Endocytic traffic also plays a role in cytokinesis. Recycling endosomes and associated components localize to the midbody and are required for cell cleavage (Monzo et al., 2005; Wilson et al., 2005; Thompson et al., 2002). However, little is known about the spatial and temporal control of dynamic membrane compartments and molecules during abscission or how these activities are coordinated to achieve cell cleavage.

The role of membrane-vesicle-tethering exocyst complexes in animal cell abscission is poorly understood. The exocyst is a multiprotein complex that targets secretory vesicles to distinct sites on the plasma membrane. In the budding yeast *S. cerevisiae*, exocyst components localize to the mother-bud neck, the site of cytokinesis (Finger et al., 1998; Mondesert et al., 1997). Exocyst disruption results in accumulation of vesicles at this site (Salminen and Novick, 1989) and impairs actomyosin-ring contraction and cell cleavage (Dobbelaere and Barral, 2004; Verplank and Li, 2005). In the fission yeast *S. pombe*, exocyst components localize to the actomyosin ring (Wang et al., 2002). Mutants for the exocyst component Sec8 accumulate 100 nm “presumptive” secretory vesicles near the division septum and cannot complete extracellular separation of the two daughter cells. A screen for cytokinesis mutants in *Drosophila melanogaster* identified the exocyst component sec5 (Echard et al., 2004), and proteomic analysis of the midbody in mammalian cells showed that the exocyst protein sec3 is at the midbody (Skop et al., 2004). Mammalian exocyst components are involved in secretion in polarized epithelial cells (Yeaman et al., 2004) and localize to the midbody (Skop et al., 2004; Wilson et al., 2005), but the function of the exocyst during cytokinesis is unclear.

Components of membrane-vesicle-tethering and -fusion complexes have been identified in some organisms and linked to cytokinesis, but the pathway that integrates these complexes with vesicle trafficking during cell cleavage is unknown. Little is known about how SNAREs and the exocyst are anchored at the midbody or how they modulate membrane-vesicle organization and fusion to coordinate abscission. Moreover, the origin and dynamics of membrane compartments involved in abscission have not been investigated. In this manuscript, we describe a multistep pathway for abscission that requires a scaffold protein to anchor

*Correspondence: stephen.doxsey@umassmed.edu

³Present address: Department of Genetics and Tumor Cell Biology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, 38105.

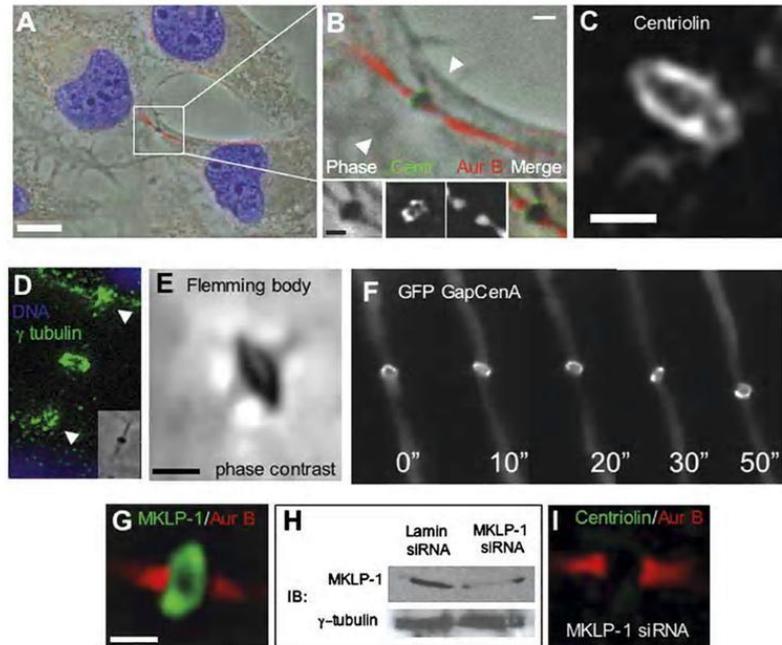


Figure 1. Centriolin Localizes to a Midbody Ring

(A) Immunofluorescence/phase image of HeLa cell during cytokinesis showing the phase-dense Flemming body within the larger diameter of the plasma membrane (arrowheads in [B]).
 (B and C). Boxed region enlarged with insets (B) to show the centriolin ring (Centr, enlarged in [C]) as part of the Flemming body (phase) and flanked bilaterally by Aurora B (Aur B).
 (D) γ -tubulin localizes to the midbody ring (inset, Flemming body) and sites of presumed microtubule minus ends (arrowheads).
 (E) The Flemming body forms a ring.
 (F) GFP-tagged GAPCenA localizes to the midbody ring and is highly dynamic (time in s).
 (G–I) MKLP-1 localizes to the midbody ring (G) and, upon depletion, mislocalizes centriolin from the midbody (I). Immunoblots (IB) from cells treated with siRNAs targeting MKLP-1 or lamin A/C (control) (H). γ -tubulin, loading control. Scale bars in (A), 10 μ m; (B), 5 μ m; (C), (E), and (G), 1 μ m.

SNARE and exocyst complexes at a unique midbody site and also requires asymmetric transport and fusion of secretory vesicles at this site.

Results

Centriolin Is Part of a Ring-like Structure at the Central Midbody during Cytokinesis

We previously showed that centriolin localized to the midbody during cytokinesis (Gromley et al., 2003). Using high-resolution deconvolution microscopy, we now demonstrate that centriolin is part of a unique ring-like structure within the central portion of the midbody, which we call the midbody ring (observed in ~75% of all telophase cells, Figures 1A–1C). The midbody ring was 1.5–2 μ m in diameter (Figure 1C), contained γ -tubulin (Figure 1D), and colocalized with the phase-dense Flemming body (Figure 1B, inset) (Paweletz, 1967). In fact, high-magnification phase-contrast imaging revealed that the Flemming body was organized into a ring-like structure (Figure 1E). The midbody ring was

flanked by Aurora B kinase, which colocalized with microtubules on either side of the ring (Figure 1B, inset). Several other proteins localized to the midbody ring including ectopically expressed GFP-GAPCenA, a GTPase-activating protein previously shown to localize to centrosomes (Cuif et al., 1999). Time-lapse imaging of GFP-GAPCenA and other proteins in living cells showed that the midbody ring was dynamic, moving between cells and tipping from side to side to reveal the ring structure (Figure 1F; see also Movie S1 in the Supplemental Data available with this article online). In addition, midbody-ring localization of GFP-GAPCenA confirmed the ring structure seen by immunofluorescence microscopy and demonstrated that there were no antibody penetration problems in this midbody region as seen for other antigens (Saxton and McIntosh, 1987). The midbody ring was distinct from the actomyosin ring and did not change in diameter during cytokinesis (Figures 1A and 1B). It appeared during the early stages of actomyosin-ring constriction and persisted until after cell cleavage (see below).

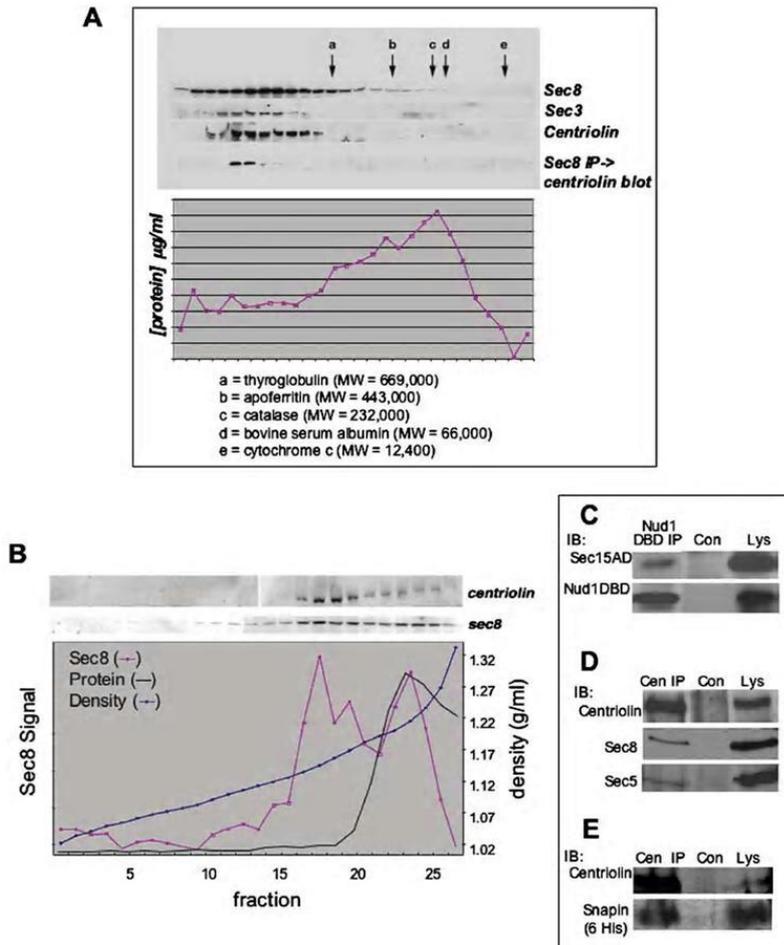


Figure 2. Centriolin Interacts with Exocyst Components and Snapin
(A) Gel filtration (Superose 6) using MDCK cell lysates shows that centriolin coelutes with peak exocyst fractions (top). Immunoprecipitation (IP) of sec8 coprecipitates centriolin. Graph, total protein profile; markers a-e are indicated.
(B) Following isopycnic centrifugation (iodixanol), centriolin comigrates in peak fractions containing sec8 (upper panels). Graph shows sec8 levels, iodixanol density, and total protein.
(C) Immunoprecipitation (IP) of Nud1-DBD (DBD antibody) pulls down sec15-AD (left). DBD, DNA binding domain; AD, activation domain; Con, control beads; Lys, lysate.
(D) Endogenous exocyst components coimmunoprecipitate with endogenous centriolin (Cen IP).
(E) Endogenous centriolin immunoprecipitates (Cen IP) overexpressed His₆-tagged snapin.

The centralspindlin components MKLP-1/CHO1/ZEN-4 (Figure 1G) and MgcRacGAP/CYK-4 (data not shown) also localized to the midbody ring and appeared earlier than centriolin during actomyosin-ring constriction. Depletion of MKLP-1 by RNAi to 18% of control levels (n = 2 experiments) prevented recruitment of centriolin to the ring (Figures 1H and 1I). In contrast, depletion of centriolin had no effect on the localization of MKLP-1 or MgcRacGAP (data not shown). These data suggested that centralspindlin anchored centriolin to the midbody ring.

Centriolin Interacts with the Exocyst Complex and the SNARE-Associated Protein Snapin and Is in Membrane-Associated Cytoplasmic Fractions

To determine the molecular function of centriolin in cytokinesis, we performed a yeast two-hybrid screen using a 120 amino acid domain of centriolin that is required for the cytokinesis function of centriolin and shares homology with budding- and fission-yeast genes (Nud1/Cdc11) involved in cytokinesis and mitotic exit (Gromley et al., 2003). A screen of approximately 12 million clones from a human testis cDNA library

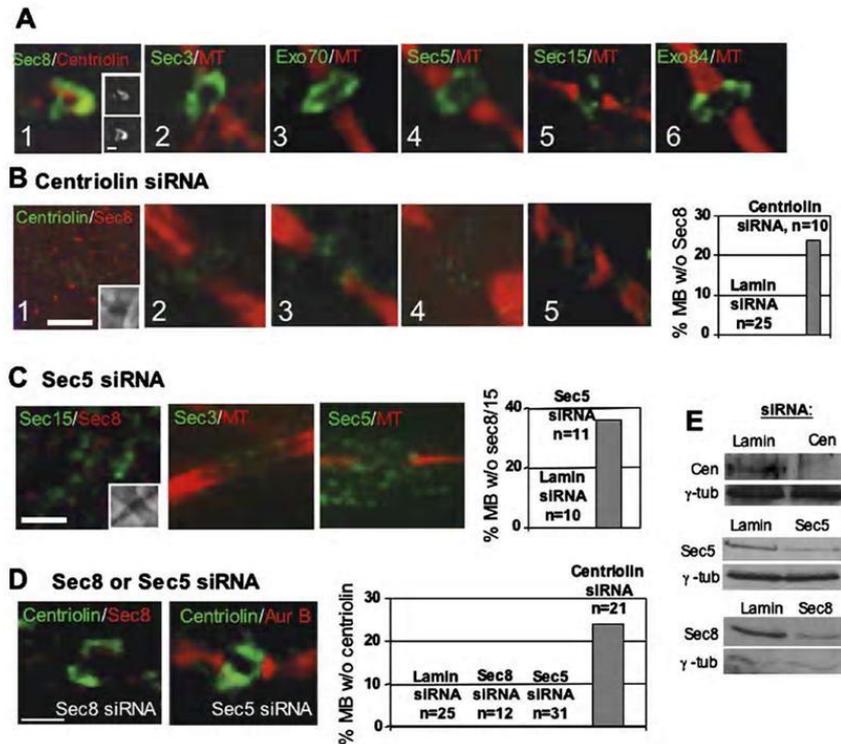


Figure 3. Exocyst Localization to the Midbody Ring Is Centriolin Dependent
 (A) Immunofluorescence images of exocyst components (green) costained with centriolin antibodies (panel 1) or with anti- α -tubulin antibody (red) to visualize microtubules (MTs, panels 2–6). Panel 1 inset: top, sec8; bottom, centriolin.
 (B) Cells depleted of centriolin lack midbody-associated exocyst. Images labeled as in A1–A5; B1 inset, Flemming body. Graph, percentage of midbodies (MB) without (w/o) sec8 signal following treatment with siRNAs targeting lamin A/C or centriolin; other cells have reduced levels (see text).
 (C) siRNA depletion of sec5 disrupts the exocyst from midbodies costained with two exocyst proteins (C1 inset, phase) or one exocyst protein and microtubules (C2–C3). Graph, percentage of midbodies (MB) lacking sec5 staining in cells treated with lamin A/C or sec5 siRNAs.
 (D) Exocyst disruption by siRNAs does not affect centriolin midbody localization. Graph, percentage of midbodies (MB) lacking centriolin stain following treatment of indicated siRNAs. Scale bar equals 1 μ m (all panels).
 (E) Immunoblots showing reduction of proteins targeted by siRNAs. γ -tubulin (γ -tub), loading control. Cen, centriolin.

yielded two potential interacting proteins: sec15, a member of the exocyst complex, and snapin, a SNARE-associated protein.

Additional biochemical analysis confirmed the yeast two-hybrid interactions and demonstrated that centriolin was in a large complex associated with membranes (Figure 2). The centriolin Nud1 domain fused to the DNA binding domain (DBD) and sec15 fused to the activation domain (AD) were coexpressed in the same yeast cells. Immunoprecipitation of the Nud1 fusion protein effectively coprecipitated the sec15 fusion protein (Figure 2C). To test whether other members of the exocyst complex were bound to centriolin, we immunoprecipitated endogenous centriolin from HeLa cell lysates with affinity-purified centriolin antibodies and showed that sec8 and sec5 coprecipitated (Figure 2D). Gel filtration experiments (Superose 6) using MDCK cell lysates

demonstrated that centriolin coeluted with fractions containing the exocyst complex (detected with antibodies to sec8 and sec3, Figure 2A). Centriolin was eluted as a single peak that overlapped with peaks of sec3 and sec8. We next asked if centriolin coimmunoprecipitated with the exocyst. Antibodies to sec8 were added to each of the fractions from the gel filtration column, and immune complexes were collected and probed with affinity-purified centriolin antibodies as described (Gromley et al., 2003). Centriolin was found only in fractions containing exocyst components (Figure 2A). The centriolin-containing fractions eluted earlier than the peak of sec 3 or sec8, suggesting that the exocyst fraction to which centriolin was bound was different from the cytosolic and lateral plasma-membrane fractions of the exocyst (Yeaman et al., 2004). The exocyst-centriolin fractions did not cofractionate with the

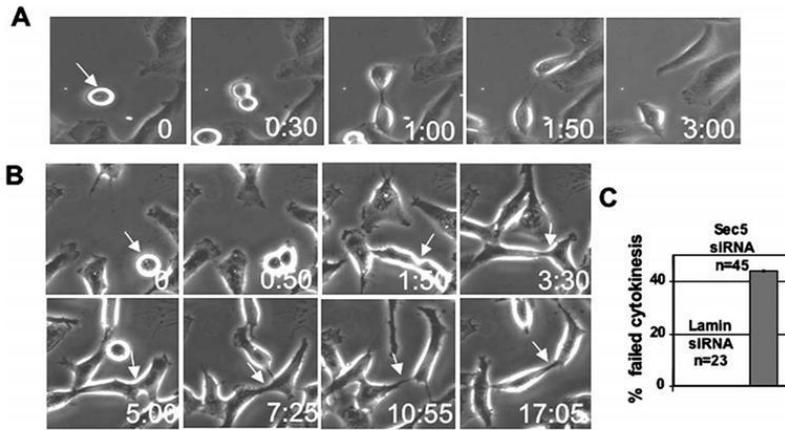


Figure 4. Exocyst Disruption Induces Cytokinesis Defects

(A) Time-lapse images of a HeLa cell treated with lamin A/C siRNAs showing a mitotic cell entering mitosis (arrow), forming a cleavage furrow, and cleaving into two separate cells in 3 hr. Time, hr:min.
 (B) A cell depleted of sec5 enters mitosis (arrow), forms a cleavage furrow with normal timing (~50 min), and remains interconnected by a thin intercellular bridge for over 17 hr (panels 1:50 through 17:05).
 (C) Graph shows percentage of mitotic cells that fail cytokinesis; many others are delayed (see text).

bulk of the cellular protein and eluted considerably earlier than thyroglobulin (MW 669,000) suggesting it was part of a large complex.

Since the exocyst associates with membrane vesicles, we next tested whether centriolin was also present in membranous fractions. Cell homogenates were prepared in the absence of detergent and underlain at the bottom of linear iodixanol gradients. Isopycnic centrifugation was performed, and fractions were probed for both centriolin and the exocyst component sec8. Centriolin “floated up” to fractions lighter than the cytosol having a buoyant density of $\delta \sim 1.14$ g/ml (Figure 2B). The centriolin peak cofractionated with a major peak of Sec8 that was slightly less dense than the junction-associated peak of Sec8 described previously in confluent MDCK cells ($\delta \sim 1.16$ g/ml; Yeaman et al., 2004). Little to no centriolin was observed at other positions in the gradient or in the major protein peak, suggesting that most if not all centriolin was associated with membranes. Taken together, the density gradient, immunoprecipitation, and chromatography data support the conclusion that centriolin associates with the exocyst in a very large complex bound to cellular membranes. The yeast two-hybrid interaction between centriolin and the low-abundance protein snapin was confirmed by showing that endogenous centriolin coimmunoprecipitated a His₆-tagged snapin fusion protein expressed in HeLa cells (Figure 2E) and by the centriolin-dependent midbody localization of snapin (see below).

The Exocyst Complex Colocalizes with Centriolin at the Midbody Ring

Further support for the centriolin-exocyst interaction was obtained by showing that exocyst-complex components localized to the midbody ring with centriolin.

HeLa cells were colabeled with antibodies against one of several exocyst components (sec3, sec5, sec8, sec15, exo70, or exo84) and either microtubules or centriolin (Figure 3A). We found that all these exocyst components localized to the midbody ring during cytokinesis and formed a ring-like structure similar to that seen for centriolin. In fact, double-stained images revealed considerable overlap between sec8 and centriolin, indicating that they were part of the same structure (Figure 3A, panel 1). We also showed that a myc-tagged form of sec8 localized to the midbody ring when expressed in HeLa cells (Figure S1), confirming the localization seen with antibodies directed to the endogenous protein.

Midbody Localization of the Exocyst Is Disrupted in Cells Depleted of Centriolin

We next tested whether centriolin was required for midbody-ring localization of the exocyst. siRNA-mediated depletion of centriolin resulted in a ~70% reduction in centriolin protein levels and complete loss of midbody staining in 24% of cells compared with control cells treated with lamin siRNA (Figures 3B and 3E). Immunofluorescence quantification of midbody signals performed as in our previous studies (Gromley et al., 2003) demonstrated that many of the remaining centriolin-depleted cells had lower levels of midbody staining than controls (48%, n = 23 cells), bringing the total percentage of midbody depleted cells to 72%. Cells that lacked detectable midbody-associated centriolin usually lacked midbody labeling of sec8 (10/10, Figure 3B, panels 1 and 6). Although other exocyst components could not be costained with centriolin because all were detected with rabbit antibodies like centriolin, all were lost from or reduced at midbodies in centriolin-depleted cells (Figure 3B, panels 2–5). For example,

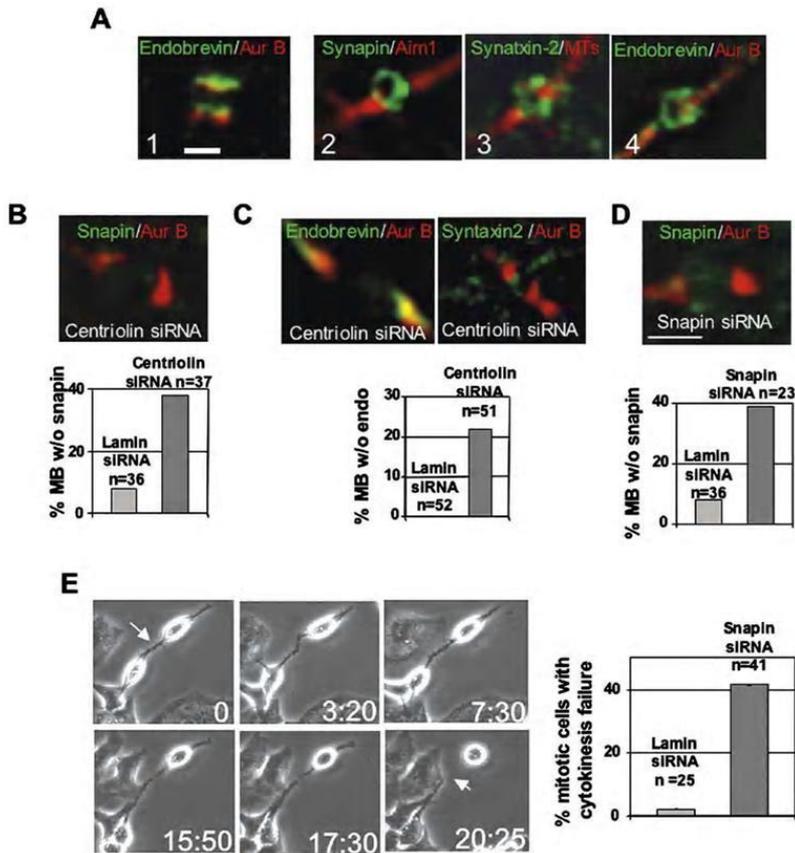


Figure 5. Centriolin siRNA Mislocalizes Midbody-Ring-Associated SNAREs and Snapin, which Disrupts Cytokinesis When Depleted
 (A) Endobrevin/VAMP8 (1) localizes adjacent to the midbody ring when snapin is on the ring (2). Later, when the midbody diameter is thin (0.5–1 μ m), endobrevin/VAMP8 and syntaxin-2 localize to the ring (3 and 4).
 (B) Centriolin-depleted cell shows loss of snapin from the midbody ring (green). Graph, percentage of midbodies lacking snapin after siRNA depletion of proteins.
 (C) Centriolin-depleted cells lose SNARE proteins from the midbody ring. Graph, percentage of midbodies lacking endobrevin/VAMP8 staining after indicated siRNAs treatments. Endo, endobrevin.
 (D) Snapin-depleted cells show loss of snapin from the midbody ring. Graph, percentage of midbodies lacking snapin after indicated siRNA treatments.
 (E) A snapin-depleted cell in cytokinesis (0) remains connected by a thin intercellular bridge for >17 hr before separating (20:25) (time, hr:min). Graph, percentage of mitotic cells that failed cytokinesis.

Exo84 was undetectable at midbodies in 22% of centriolin-depleted cells ($n = 9$ cells) or had levels below the lowest control midbody staining in 42% of centriolin-depleted cells ($n = 19$ cells). Significant reduction in midbody staining of centriolin and other exocyst components was observed with a second siRNA targeting a different centriolin sequence (Gromley et al., 2003) (data not shown).

To test whether centriolin was dependent on the exocyst complex for localization to the midbody, we initially targeted *sec5* for siRNA depletion. Recent studies showed that mutants of *sec5* in *D. melanogaster* dis-

rupted exocyst function (Murthy and Schwarz, 2004) and that RNAi-mediated depletion of *sec5* inhibited exocyst-dependent processes in vertebrate cells (Prigent et al., 2003). We found that depletion of *sec5* resulted in loss of midbody-associated *sec5* as well as other exocyst components, including *sec3*, *sec8*, and *sec15* (Figures 3C and 3E). These results show that *sec5* depletion disrupts midbody-ring localization of the exocyst. In contrast, neither *sec5* nor *sec8* loss from the midbody affected the association of centriolin with the midbody ring (Figures 3D and 3E). These data demonstrate that centriolin is required for midbody localiza-

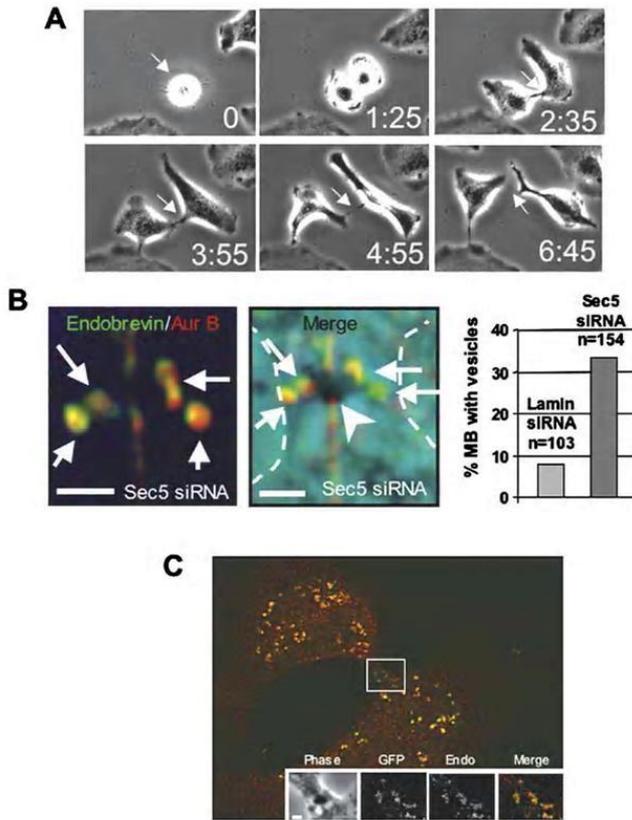


Figure 6. Disruption of the Exocyst Results in Accumulation of Secretory Vesicles at the Midbody Ring

(A) A mitotic cell (0, arrow) treated with BFA exits mitosis and forms a cleavage furrow with normal timing but arrests with a thin intercellular bridge that connects the two daughters (panels 2:35 through 6:45). (B) *sec5* siRNA-treated cells accumulate endobrevin/VAMP8-containing vesicle-like structures (arrows) at the Flemming body (arrowhead, panel 2). Dotted lines, plasma membrane. Graph, percentage of cells with endobrevin/VAMP8 vesicles at the midbody following indicated siRNA treatments. Scale bars, 2 μ m. (C) Endobrevin/VAMP8 (green) localizes to luminal-GFP secretory vesicles (red). Box at midbody is enlarged in insets. Endo, endobrevin/VAMP8.

tion of the exocyst, while localization of centriolin appears to be independent of the exocyst.

Disruption of the Exocyst Causes Failure at the Final Stages of Cytokinesis

Localization of the exocyst to the midbody and its interaction with centriolin suggested that the complex might play a role in cytokinesis. To examine this, we disrupted the midbody-associated exocyst using siRNAs targeting *sec5* and examined cytokinesis by time-lapse imaging over a 20 hr time period. We found that over half the cells exhibited severe cytokinesis defects, including failure in the final abscission step (42%, Figures 4B and 4C, Movie S3) and delays during cytokinesis (24%, n = 18) compared with control lamin siRNA-treated cells (Figures 4A and 4C, Movie S2). Some cells remained interconnected by thin cytoplasmic bridges (Figure 4B, panel 17:05 and Movie S3) and sometimes entered one or more additional rounds of mitosis while still connected to their partner cells. *Sec5*-depleted cells viewed for an additional 24 hr showed a similar level of cytokinesis defects (data not shown), suggesting that nearly all cells in the culture experienced cytokinesis problems over time. Cytokinesis defects were

also observed when the exocyst was disrupted by siRNA depletion of *sec15* and *sec8* (data not shown). Cells remained healthy, as no differences in cell morphology or mitochondrial function were observed. These data show that disruption of the exocyst produces late-stage cytokinesis defects similar to centriolin (Gromley et al., 2003) and demonstrates a requirement for the exocyst in the final stages of animal cell cytokinesis.

Snapin and SNARE Components Localize to the Midbody Ring in a Centriolin-Dependent Manner

Snapin was originally considered to be a neuron-specific protein, but recent studies demonstrated that it is also expressed in nonneuronal cells (Buxton et al., 2003). Snapin may facilitate assembly of SNARE complexes and may define a limiting step in vesicle fusion mediated by PKA phosphorylation (Chheda et al., 2001). Although the role of snapin in neurotransmission has been questioned (Vites et al., 2004), recent results indicate that it is essential for this process (Thakur et al., 2004). The role of snapin in cytokinesis is currently unknown. Using previously characterized antibodies to snapin (Thakur et al., 2004), we demonstrated that the

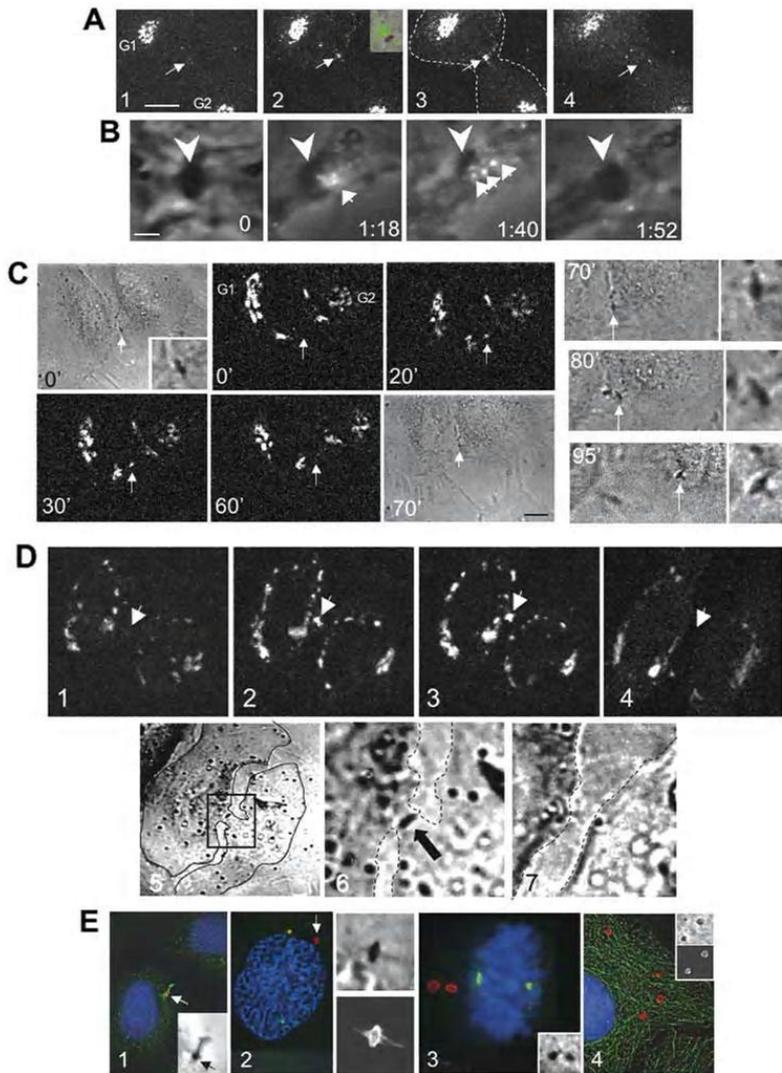


Figure 7. Asymmetric Delivery of Secretory Vesicles to One Side of the Flemming Body Is Followed by Abscission at This Site

(A) A dividing HeLa cell expressing luminal GFP accumulates secretory vesicles on one side of the Flemming body (arrows in 2 and 3, inset). In panel 1, most luminal-GFP signal is in Golgi complexes (G1 and G2). The signal appears transiently at one side of the midbody (2 and 3, arrows; Movie S5) and is lost, although Golgi signal remains (4). Scale bar in panel 1, 10 μm .

(B) Higher-magnification images of another cell (see Movie S6) showing unidirectional delivery of luminal-GFP-containing vesicles from one nascent daughter cell to one side of the Flemming body (arrowhead). GFP vesicles move to the Flemming body from the cell on the right (1:18 and 1:40, arrows; see Movie S6) and quickly disappear (1:52), presumably due to vesicle fusion with the plasma membrane and diffusion of the signal into the extracellular space. Phase and GFP signals are overlaid. Time, hr:min. Scale bar in panel 1, 1 μm .

(C) Lum-GFP vesicle delivery to the Flemming body (0'-30', arrows) followed by signal loss (60', at arrow) and abscission (80' and 95'). Phase-contrast images were taken after disappearance of GFP signal. Enlargements of Flemming body are shown to the right of each low-magnification image in 70'-95'. Scale bar at 70': 10 μm for 0'-95' and 2 μm for enlargements in 70'-95'.

(D) Lum-GFP vesicle delivery to one side of the midbody (panels 1-3) followed by disappearance of the GFP signal (panel 4) and abscission (loss of intercellular bridge, panels 5-7, arrows). The box in panel 5 is enlarged in panel 6. Solid and dotted lines show cell boundaries.

(E) Postmitotic cell (1) showing microtubules (green, GT335 antibody) of the intercellular bridge (phase-contrast image, inset) attached to one of the two daughter cells; no detectable midbody microtubules are seen on the other cell. Microtubules are on both sides of the midbody ring (arrow, red, MKLP-1) and Flemming body (inset, phase), showing that the midbody with attached microtubules was delivered to one daughter cell. Prophase HeLa cell (2) with condensing chromatin (blue) and two centrosomes (green) has a midbody ring and lateral material

protein localized to the midbody ring at the same time as the exocyst and shortly after centriolin (Figure 5A, panel 2).

Previous immunofluorescence studies showed that the v-SNARE endobrevin/VAMP8 and t-SNARE syntaxin-2 were enriched in the region of the midbody flanking the Flemming body and coincident with microtubules and Aurora B staining (Low et al., 2003). Using the same antibodies, we confirmed the localization pattern of endobrevin/VAMP8 (Figure 5A, panel 1) and syntaxin-2 (data not shown). Very late in cytokinesis, the intercellular bridge narrows to $\sim 0.5 \mu\text{m}$, and microtubule bundles are reduced in diameter to $0.2\text{--}0.5 \mu\text{m}$. At this time, endobrevin/VAMP8 and syntaxin-2 joined centriolin, snapin, and the exocyst at the midbody ring (Figure 5A, panels 3 and 4). siRNA depletion of centriolin eliminated the midbody-ring localization of snapin ($>35\%$ of cells, Figure 5B), endobrevin/VAMP8 ($>20\%$ of cells, Figure 5C), and syntaxin-2 (Figure 5C). Of the remaining cells, 24% and 36% showed midbody staining levels below those of controls for snapin ($n = 22$) and endobrevin/VAMP8 ($n = 25$), respectively. As shown earlier, midbody-ring integrity was not compromised under these conditions, as MKLP-1 and MgcRacGAP remained at this site in cells with reduced centriolin. These results indicated that centriolin was required for midbody-ring localization of v- and t-SNARE proteins and the SNARE-associated protein snapin.

Snapin Depletion Mislocalizes the Protein from the Midbody and Induces Cytokinesis Defects

Midbodies in 41% of snapin-depleted cells showed no detectable snapin staining (Figure 5D). Time-lapse imaging over a 22 hr period showed that 40% of snapin-depleted cells experienced late-stage cytokinesis failure (Figure 5E, Movie S4). Other cells showed long delays and often remained connected by a thin intercellular bridge (data not shown). When cultures were imaged for an additional 24 hr, we observed multicellular syncytia resulting from multiple incomplete divisions and additional individual cells undergoing cytokinesis failure. This suggested that most cells in the population ultimately failed cytokinesis and that some failed multiple times. Occasionally, cells separated when one of the attached daughters re-entered mitosis, possibly due to tensile forces generated by cell rounding during mitosis (Figure 5E, Movie S4). These results demonstrated that snapin was necessary for abscission and suggested that it functioned by anchoring SNARE complexes at the midbody.

Disruption of the Exocyst Results in Accumulation of Secretory Vesicles at the Midbody

We next tested whether the late-stage cytokinesis defects observed in this study resulted from changes in membrane trafficking to the midbody. As a first test of this idea, we used brefeldin A, which disrupts cytokine-

sis in *C. elegans* presumably due to inhibition of post-Golgi secretory-vesicle trafficking (Skop et al., 2001). In HeLa cells treated with brefeldin A, we observed late-stage cytokinesis defects (Figure 6A) that were similar to those observed following depletion of centriolin. Many cells were delayed in or failed cytokinesis ($n = 9/13$ cells in two separate experiments). This suggested that post-Golgi vesicle trafficking was involved in late-stage cytokinesis events in vertebrate cells, although brefeldin A is known to affect other membrane-trafficking pathways (Antonin et al., 2000).

Based on the localization of the exocyst to the midbody ring, we reasoned that the vesicle-tethering function of the complex might be operating at this site to facilitate fusion of v-SNARE-containing vesicles at the late stages of cytokinesis. To test this idea, we depleted cells of *sec5* to disrupt exocyst complexes and examined the localization of v-SNARE (endobrevin/VAMP8) containing vesicles. We observed a collection of small, spherical endobrevin/VAMP8-containing structures resembling vesicles at the midbody (Figure 6B, panel 1, arrows) that were positioned around the phase-dense Flemming body (Figure 6B, arrowhead, panel 2). Although these structures were occasionally seen in control lamin A/C siRNA-treated cells, they were significantly increased in *sec5*-depleted cells (Figure 6B, graph).

To determine whether the endobrevin/VAMP8-containing structures were secretory vesicles, we used a more specific marker for the secretory pathway. We expressed a GFP-tagged construct containing an amino-terminal signal peptide that targets the protein to the lumen of the ER (lum-GFP) (Blum et al., 2000) and lacks retention and retrieval motifs, so it would not be expected to target to endosomes, multivesicular bodies, or lysosomes. The lum-GFP was efficiently secreted from nondividing MDCK cells following a 19°C trans-Golgi network block and release from the block in the presence of protein-synthesis inhibitors (C.Y., unpublished data). When we expressed lum-GFP, numerous GFP-containing vesicles were observed in the cytoplasm. Following fixation and staining for endobrevin/VAMP8, we found that most of the endobrevin/VAMP8 vesicles colabeled with lum-GFP throughout the cytoplasm (Figure 6C) and within the intercellular bridge during late stages of cytokinesis (Figure 6C, insets). This observation demonstrates that the v-SNARE-containing vesicles that accumulated following disruption of the exocyst are secretory vesicles, an observation similar to that seen in studies in exocyst mutants of *S. cerevisiae* where vesicles dock normally but fail to fuse with the plasma membrane (Guo et al., 2000)

Asymmetric Delivery of Secretory Vesicles to the Midbody Is Followed by Abscission

At early stages of cytokinesis, we observed numerous GFP-labeled secretory vesicles in Golgi complexes and

stained with MKLP-1 (arrow, red) and in enlargement (bottom right); the Flemming body with flanking material is enlarged at upper right. Metaphase cell (3) with two midbody rings stained for MKLP-1 (red). Inset, two Flemming bodies corresponding to the two MKLP-1-stained structures. Centriosomes, green; DNA, blue. Interphase cell (4) showing four MKLP-1-stained midbody rings (red). Two are enlarged in lower inset and colocalize with phase-dense Flemming bodies (upper inset). DNA, blue; microtubules, green.

cell bodies of nascent daughter cells but few within intercellular bridges (Figure 7A, panel 1). However, at a late stage of cytokinesis when the intercellular bridge narrowed to a diameter of $\sim 2 \mu\text{m}$ and the midbody microtubule bundle was reduced to a diameter of $0.5\text{--}1 \mu\text{m}$, GFP secretory vesicles accumulated in the intercellular bridge near the midbody ring (Figure 7A, Movie S5). Higher-magnification imaging of another cell at a similar cell-cycle stage revealed labeled secretory vesicles moving suddenly and rapidly (within 20 min) from the cell bodies into the intercellular bridge and up to the midbody ring (Figure 7B, Movie S6). In 11/11 cells, the vesicles were delivered primarily if not exclusively from one of the nascent daughter cells (Figure 7B, center panels). Vesicles packed into the region adjacent to the phase-dense Flemming body (Figure 7B, panels 2 and 3, large arrowhead; Movie S6). Within 20 min, the GFP signal disappeared (Figure 7B, last panel and Figure 7A, last panel), suggesting that the vesicles fused with the plasma membrane, releasing the GFP signal into the extracellular space where it was free to diffuse. Loss of the GFP signal was not due to photobleaching because GFP-labeled vesicles in cell bodies adjacent to the intercellular bridge and in the Golgi complex retained the signal. We next examined the relationship between vesicle delivery to the midbody and abscission. We found that, shortly after the GFP signal was lost from the midbody region, the cell cleaved on the side of the Flemming body that received the GFP vesicles (6/6 cells from four experiments, Figure 7C). The cell on the opposite side received the Flemming body (Figure 7C, 70'–95' and Figure 7D). In some cases, the Flemming body moved around rapidly after abscission on the cell surface (Movie S7), suggesting that the structure was not anchored at a discrete point on the new daughter cell. Postdivision midbodies contained multiple midbody-ring components and retained microtubules from both sides of the midbody ring (Figure 7E, panel 1). They persisted for some time after abscission, consistent with previous results (Mishima et al., 2002), and were often present in multiple copies, suggesting that they were retained through several cell cycles (Figure 7E, panels 2–4). These structures were seen on $\sim 35\%$ of HeLa cells and often retained features of the Flemming body and midbody ring, including MKLP-1 staining, Aurora B staining, phase-dense Flemming bodies, and localization to the plasma membrane (Figure 7E, data not shown). This suggested that supernumerary midbodies represent structures from previous divisions similar to the bud scars observed in yeast (Chen and Contreras, 2004).

Discussion

A Model for the Final Stage of Cytokinesis

This study defines several distinct molecular and structural steps during the late stages of cytokinesis (Figure 8). During cleavage-furrow ingression, MKLP-1 and MgcRacGAP arrive at the midbody ring (Figure 8A). When the intercellular bridge forms, centriolin localizes to the ring (Figure 8B), followed by snapin and exocyst proteins (Figure 8C). When the diameter of the midbody microtubule bundle and the intercellular bridge are

reduced to $\sim 0.5\text{--}1 \mu\text{m}$, endobrevin/VAMP8 (v-SNARE) and syntaxin-2 (t-SNARE) move to the midbody ring. The v-SNAREs are part of secretory vesicles that move asymmetrically into the intercellular bridge predominantly from one nascent daughter cell; binding to v-SNAREs may incorporate t-SNAREs into this organization. The vesicles pack into the area adjacent to the ring and appear to fuse, releasing their contents into the extracellular space (lum-GFP, Figures 8D and 8E). Vesicle fusion with the plasma membrane may be initiated near the midbody ring where v- and t-SNAREs are localized. This could be followed by additional fusion events between vesicles and the plasma membrane as well as vesicle-vesicle fusion events (homotypic) mediated by SNAP23/25, a v-SNARE involved in compound exocytosis (Takahashi et al., 2004) (Figures 8F and 8G). Abscission then occurs at the site of vesicle fusion, and the entire midbody remains with the daughter cell opposite the fusion site (Figure 8H). Abscission could be triggered by arrival of v- and t-SNAREs at the midbody ring; release of SNAP23/25 from lipid rafts (Takahashi et al., 2004; Takeda et al., 2004); phosphorylation of snapin by PKA, which mediates its binding to the t-SNARE complex (Buxton et al., 2003; Chheda et al., 2001); or another event. Dynamic movement of the postabscission midbody ring suggests connections to motile forces within the cell, although this remains to be determined.

Asymmetric Delivery of Secretory Vesicles Marks the Site of Abscission

It is remarkable that secretory vesicles loaded with luminal GFP move into the intercellular bridge from only one of the two prospective daughter cells. The mechanism of this asymmetric vesicle delivery is unknown. It is tempting to speculate that a signal, negative or positive, emanates asymmetrically from one centrosome in the dividing cell. Centrosomes in the two prospective daughter cells are different in that one was "born" from the older centriole in the previous cell division during the centrosome duplication process (Doxsey, 2001). Consistent with this idea is the asymmetric spindle-pole body (SPB) localization of budding- and fission-yeast proteins that control mitotic exit and cytokinesis (Doxsey et al., 2005; Grallert et al., 2004; Molk et al., 2004). In *S. pombe*, inhibitors of mitotic exit (Cdc16p and Byr4p) localize to the "old" SPB while activators of mitotic exit (Cdc7p and presumably Sid1p and Cdc14p) localize to the new SPB (Grallert et al., 2004). The relevance of this localization in both yeasts is still unknown. Further studies will be required to determine the role of centrosome protein asymmetry in the unidirectional delivery of secretory vesicles and abscission in animal cells. It has been suggested that the mother centriole moves to the intercellular bridge in telophase cells to coordinate the final steps in cytokinesis (Piel et al., 2001), although this was not consistently observed in this study (data not shown) or another that investigated several cell lines (RPE-1, Ptk-1, CV-1, NRK-52E; A. Khodjakov, personal communication).

The final stages of cytokinesis in animal cells share features with cell division in higher plants. Higher plant cells cannot divide using an actomyosin-based cleavage furrow due to the presence of a nonpliant cell wall,

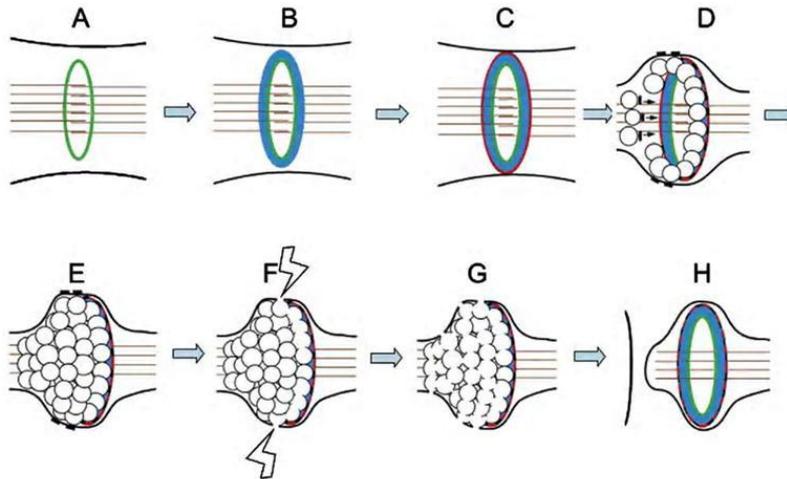


Figure 8. Model Depicting Vesicle-Mediated Abscission during Cytokinesis

(See text for details.)

(A) MKLP-1 and MgcRacGAP (green) arrive at midbody ring after cleavage furrowing has progressed. Microtubules, brown; plasma membrane, upper and lower lines.

(B and C) Centriolin moves to ring ([B], blue) and anchors sec15, other exocyst components, and snapin ([C], red).

(D) When midbody microtubules are reduced and the membrane constricted, v- and t-SNAREs ([D], black) move to the midbody ring from one prospective daughter cell. v-SNAREs presumably move with vesicles and bind there in a centriolin-dependent manner; t-SNAREs on the plasma membrane could bind through v-SNAREs.

(E) Vesicles heterogeneous in diameter pack asymmetrically into the intercellular bridge adjacent to the midbody ring.

(F and G) Vesicles adjacent to the ring containing SNAREs and exocyst fuse with the plasma membrane (F) as well as at other plasma-membrane sites and with one another (G).

(H) Abscission follows at the site of membrane fusion, and the midbody is retained by the daughter cell opposite the fusion site. The released midbody ring contains multiple midbody-ring proteins and usually retains microtubule bundles from both sides of the ring. (In this model, the apparent "layering" of components is a simplification to depict arrival of different components at the midbody.)

so they accomplish cell division by constructing a new membrane at the division plane, called the cell plate, that is independent of the plasma membrane and is established by microtubule-dependent delivery and fusion of vesicles at this site (Albertson et al., 2005; Finger and White, 2002; Jurgens, 2005). Our data show that the coordinated delivery of vesicles to the midbody ring during the late stages of cytokinesis is also required for the final stages of cell division in animal cells. However, we still do not understand the mechanism of secretory-vesicle delivery to the midbody, the role of microtubules in this process, or the precise contribution of vesicle transport and fusion to abscission. The presence of vesicles with heterogeneous diameters adjacent to the midbody ring prior to abscission is consistent with a model in which some vesicles fuse together prior to fusion with the plasma membrane. This would be analogous to the cell plate in plant cells. The endocytic pathway also appears to play a role in cell cleavage as components (dynamin, FIP3, Rab11) and compartments (endosomes) involved in this pathway affect the late stages of cytokinesis (Thompson et al., 2002; Wilson et al., 2005). Recycling endosomes have been shown to move from both prospective daughter cells to the midbody during cytokinesis then return to the daughter-cell cytoplasm (Wilson et al., 2005). It is still

unclear how recycling endosomes participate in abscission and how the bidirectional movement of endosomes into the intercellular bridge is related to the unidirectional movement of secretory vesicles to this site in our study.

Structure and Persistence of the Midbody Ring

We have shown that many proteins localize to the midbody ring and that the phase-dense Flemming body is also organized into the shape of a ring. This is consistent with earlier ultrastructural studies that describe cytoplasmic channels coursing through the central midbody (Mullins and Biesele, 1977). The ring structure bears a resemblance to bud scars of *S. cerevisiae*, which serve as markers for longevity (Chen and Contreras, 2004). The midbody ring in animal cells is inherited by the daughter cell that lies opposite the site of vesicle delivery and appears to persist, as it is often seen in mitotic cells prior to cytokinesis and found in multiple copies in interphase cells (Figure 7E) (Mishima et al., 2002). Shortly after abscission, the midbody ring contains microtubules that extend from both sides of the ring. This suggests that dissolution of microtubule bundles adjacent to the midbody ring is not an absolute requirement for the final stage of cytokinesis but rather that abscission can result in transfer of the entire mid-

body and associated microtubules into one daughter cell.

Experimental Procedures

Cell Culture and Transfections

The cells used primarily in this study were diploid, telomerase-immortalized human RPE cells (hTERT-RPE-1s, Clontech Laboratories, Inc.) (Morales et al., 1999) and HeLa cells. All cells were grown as previously described (American Type Culture Collection). HeLa cells were transfected as previously described (Lipofectamine, Invitrogen).

Immunofluorescence

Cells were prepared for immunofluorescence, imaged, and deconvolved (Metamorph, Universal Imaging Corp.) using either formaldehyde, formaldehyde followed by methanol, or methanol alone as previously described (Dicthenberg et al., 1998). All immunofluorescence images are two-dimensional projections of three-dimensional reconstructions to ensure that all stained material was visible in two-dimensional images. Quantification of signals produced by immunofluorescence staining for various midbody antigens was performed as described for centrosome protein quantification in our earlier studies (Gromley et al., 2003).

Antibodies

Antibodies to the following proteins were used: sec3, sec5, sec8, sec10, exo70, exo84, and sec15 (Yeaman, 2003); centriolin (Gromley et al., 2003); α -tubulin, γ -tubulin, α -His₆, and α -myc (Sigma-Aldrich); Aurora B (Transduction Laboratories); MKLP-1, GAL4 transactivation domain (AD), and GAL4 DNA binding domain (DBD) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.); and GT335 for stabilized microtubules (Gromley et al., 2003).

Yeast Two-Hybrid Screen

Yeast two-hybrid library screens were performed following the manufacturer's instructions using a human testis Matchmaker Pre-Transformed Two-Hybrid Library (Matchmaker GAL4 Yeast Two-Hybrid System, Clontech). False positives were eliminated by mating each clone with strains expressing either lamin C or the DNA binding domain alone and plating on quadruple dropout media.

siRNAs

Two siRNAs targeting centriolin and one targeting lamin A/C were used as described (Gromley et al., 2003). Additional siRNAs targeted nucleotides in the following proteins: MKLP-1 (189–207), sec5 (260–278), sec8 (609–627), and snapin (312–330). Cells were examined 24–48 hr after siRNA treatment. siRNAs were used at 10–50 nM, and Lipofectamine was the delivery agent (Gromley et al., 2003).

Brefeldin A Treatment

HeLa cells were treated with 5–10 μ g/ml brefeldin A (Sigma-Aldrich) and imaged.

Immunoprecipitations

Antibodies to centriolin or exocyst were added to hTERT-RPE cell extracts and incubated at 4°C overnight. The lysis buffer included 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-1630, and protease inhibitors (Mini tablets, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Superose 6 samples were incubated with antibodies to sec3 and sec8, bound to protein A/G beads (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) at 4°C for 2 hr (Yeaman, 2003), and exposed to SDS-PAGE and immunoblotting (Harlow and Lane, 1988).

Time-Lapse Imaging

Time-lapse imaging of cytokinesis was performed using a wide-field microscope (Gromley et al., 2003), and images were taken every 5 min for 18–24 hr. For luminal-GFP-expressing cells (Figure 7B), two concurrent time-lapse programs were used (GFP, phase contrast), and images were taken every 2 min for 3–4 hr. A PerkinElmer spinning-disc confocal microscope with an UltraVIEW CSU-

10 head was used for Figures 7A, 7C, and 7D. Images were taken every 5 min and captured on an ORCA-AG cooled CCD camera. Images of GFP-GAPCenA-expressing cells were taken every 10 min on a Zeiss Axiophot microscope equipped with a Hamamatsu digital camera. Mitochondria function was assessed by Mitotracker staining (Molecular Probes).

Exocyst Fractionation

For isopycnic centrifugation, membrane compartments containing exocyst fractions were prepared as described (Grindstaff et al., 1998; Yeaman, 2003). For size-exclusion chromatography, cells were extracted with MEBC buffer (0.5% Nonidet P-40, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl) containing protease inhibitors (0.1 mM Na₃VO₄; 50 mM NaF; 1 mM Pefabloc [Boehringer Mannheim]; and 10 μ g/ml each of leupeptin, antipain, chymostatin, and pepstatin A) for 10 min at 4°C. Lysates were first sedimented in a Microfuge (Beckman Instruments, Fullerton, California) for 10 min and then for 30 min at 100,000 \times g, passed through a 0.22 μ m filter (Millipore), and loaded on a Superose 6 HR 10/30 column (200 μ l, 10 mm \times 30 cm; Pharmacia Biotech, Inc.) equilibrated in MEBC buffer and 1 mM dithiothreitol with 0.1 mM Pefabloc. Proteins were eluted (0.3 ml/min) at 17°C in 0.5 ml fractions, the concentration of protein in the fractions was determined, and the fractions were used for various assays (fractions 7–30).

Supplemental Data

Supplemental Data include one figure and seven movies and can be found with this article online at <http://www.cell.com/cgi/content/full/123/1/75/DC1/>.

Acknowledgments

We thank Dan McCollum, Yu-Li Wang, Ted Salmon, and Bill Theurkauf for useful discussions. We thank Z. Sheng (NINDS, NIH) (snapin), T. Wiembs (Lerner Institute, Cleveland) (endobrevin/VAMP8 and syntaxin-2) and M. Glotzer (IMP, Vienna) (MKLP-1, MgcRacGAP) for antibodies. This work was supported in part by grants from the National Institutes of Health to S.J.D. (GM51994) and from the Department of Defense to C.Y. (DAMD-17-03-1-0187).

Received: August 18, 2004

Revised: June 3, 2005

Accepted: July 27, 2005

Published: October 6, 2005

References

- Albertson, R., Riggs, B., and Sullivan, W. (2005). Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 15, 92–101.
- Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Honing, S., and Jahn, R. (2000). The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. *Mol. Biol. Cell* 11, 3289–3298.
- Blum, R., Stephens, D.J., and Schulz, I. (2000). Luminal targeted GFP, used as a marker of soluble cargo, visualises rapid ERGIC to Golgi traffic by a tubulo-vesicular network. *J. Cell Sci.* 113, 3151–3159.
- Buxton, P., Zhang, X.M., Walsh, B., Sriratanana, A., Schenberg, I., Manickam, E., and Rowe, T. (2003). Identification and characterization of Snapin as a ubiquitously expressed SNARE-binding protein that interacts with SNAP23 in non-neuronal cells. *Biochem. J.* 375, 433–440.
- Chen, C., and Contreras, R. (2004). The bud scar-based screening system for hunting human genes extending life span. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1019, 355–359.
- Chheda, M.G., Ashery, U., Thakur, P., Rettig, J., and Sheng, Z.H. (2001). Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. *Nat. Cell Biol.* 3, 331–338.
- Cuif, M.H., Possmayer, F., Zander, H., Bordes, N., Jollivet, F., Couedel-Courteille, A., Janoueix-Lerosey, I., Langsley, G., Bornens, M., and Goud, B. (1999). Characterization of GAPCenA, a GTPase

- activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome. *EMBO J.* 18, 1772–1782.
- Dicthenberg, J., Zimmerman, W., Sparks, C., Young, A., Vidair, C., Zheng, Y., Carrington, W., Fay, F., and Doxsey, S.J. (1998). Pericentrin and gamma tubulin form a protein complex and are organized into a novel lattice at the centrosome. *J. Cell Biol.* 141, 163–174.
- Dobbelaere, J., and Barral, Y. (2004). Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science* 305, 393–396.
- Doxsey, S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 688–698.
- Doxsey, S., McCollum, D., and Theurkauf, W. (2005). Centrosomes in cellular regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 688–698. in press.
- Echard, A., Hickson, G.R., Foley, E., and O'Farrell, P.H. (2004). Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen. *Curr. Biol.* 14, 1685–1693.
- Finger, F.P., and White, J.G. (2002). Fusion and fission: membrane trafficking in animal cytokinesis. *Cell* 108, 727–730.
- Finger, F.P., Hughes, T.E., and Novick, P. (1998). Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* 92, 559–571.
- Glotzer, M. (2001). Animal cell cytokinesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 351–386.
- Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307, 1735–1739.
- Grallert, A., Krapp, A., Bagley, S., Simanis, V., and Hagan, I.M. (2004). Recruitment of NIMA kinase shows that maturation of the *S. pombe* spindle-pole body occurs over consecutive cell cycles and reveals a role for NIMA in modulating SIN activity. *Genes Dev.* 18, 1007–1021.
- Grindstaff, K.K., Yeaman, C., Anandasabapathy, N., Hsu, S.C., Rodriguez-Boulant, E., Scheller, R.H., and Nelson, W.J. (1998). Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell* 93, 731–740.
- Gromley, A., Jurczyk, A., Sillibourne, J., Halilovic, E., Mogensen, M., Groisman, I., Blomberg, M., and Doxsey, S. (2003). A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *J. Cell Biol.* 161, 535–545.
- Guertin, D.A., Trautmann, S., and McCollum, D. (2002). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 155–178.
- Guo, W., Sacher, M., Barrowman, J., Ferro-Novick, S., and Novick, P. (2000). Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol.* 10, 251–255.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Jurgens, G. (2005). Plant cytokinesis: fission by fusion. *Trends Cell Biol.* 15, 277–283.
- Low, S.H., Li, X., Miura, M., Kudo, N., Quinones, B., and Weimbs, T. (2003). Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells. *Dev. Cell* 4, 753–759.
- Mishima, M., Kaitna, S., and Glotzer, M. (2002). Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev. Cell* 2, 41–54.
- Molk, J.N., Schuyler, S.C., Liu, J.Y., Evans, J.G., Salmon, E.D., Pellman, D., and Bloom, K. (2004). The differential roles of budding yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p protein dynamics in mitotic exit. *Mol. Biol. Cell* 15, 1519–1532.
- Mondesert, G., Clarke, D.J., and Reed, S.I. (1997). Identification of genes controlling growth polarity in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a possible role of N-glycosylation and involvement of the exocyst complex. *Genetics* 147, 421–434.
- Monzo, P., Gauthier, N.C., Keslair, F., Loubat, A., Field, C.M., Le Marchand-Brustel, Y., and Cormont, M. (2005). Clues to CD2-associated protein involvement in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 16, 2891–2902. 10.1091/mbc.E04-09-0773
- Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.E., and Shay, J.W. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat. Genet.* 21, 115–118.
- Mullins, J.M., and Bieseke, J.J. (1977). Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J. Cell Biol.* 73, 672–684.
- Murthy, M., and Schwarz, T.L. (2004). The exocyst component Sec5 is required for membrane traffic and polarity in the *Drosophila* ovary. *Development* 131, 377–388.
- Papoulias, O., Hays, T.S., and Sisson, J.C. (2004). The golgin Lava lamp mediates dynein-based Golgi movements during *Drosophila* cellularization. *Nat. Cell Biol.* 7, 612–618. 10.1038/ncb1264
- Paweletz, N. (1967). On the function of the 'Flemming body' during division of animal cells. *Naturwissenschaften* 54, 533–535.
- Piel, M., Nordberg, J., Euteneuer, U., and Bornens, M. (2001). Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells. *Science* 291, 1550–1553.
- Prigent, M., Dubois, T., Raposo, G., Derrien, V., Tenza, D., Rosse, C., Camonis, J., and Chavrier, P. (2003). ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J. Cell Biol.* 163, 1111–1121.
- Salminen, A., and Novick, P.J. (1989). The Sec15 protein responds to the function of the GTP binding protein, Sec4, to control vesicular traffic in yeast. *J. Cell Biol.* 109, 1023–1036.
- Saxton, W.M., and McIntosh, J.R. (1987). Interzone microtubule behavior in late anaphase and telophase spindles. *J. Cell Biol.* 105, 875–886.
- Skop, A.R., Bergmann, D., Mohler, W.A., and White, J.G. (2001). Completion of cytokinesis in *C. elegans* requires a brefeldin A-sensitive membrane accumulation at the cleavage furrow apex. *Curr. Biol.* 11, 735–746.
- Skop, A.R., Liu, H., Yates, J., Meyer, B.J., and Heald, R. (2004). Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science* 305, 61–66. Published online May 27, 2004.
- Strickland, L.I., and Burgess, D.R. (2004). Pathways for membrane trafficking during cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 14, 115–118.
- Takahashi, N., Hatakeyama, H., Okado, H., Miwa, A., Kishimoto, T., Kojima, T., Abe, T., and Kasai, H. (2004). Sequential exocytosis of insulin granules is associated with redistribution of SNAP25. *J. Cell Biol.* 165, 255–262.
- Takeda, T., Kawate, T., and Chang, F. (2004). Organization of a sterol-rich membrane domain by cdc15p during cytokinesis in fission yeast. *Nat. Cell Biol.* 6, 1142–1144.
- Thakur, P., Stevens, D.R., Sheng, Z.H., and Rettig, J. (2004). Effects of PKA-mediated phosphorylation of Snapin on synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 24, 6476–6481.
- Thompson, H.M., Skop, A.R., Euteneuer, U., Meyer, B.J., and McNiven, M.A. (2002). The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis. *Curr. Biol.* 12, 2111–2117.
- Verplank, L., and Li, R. (2005). Cell cycle-regulated trafficking of Chs2 controls actomyosin ring stability during cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 16, 2529–2543.
- Vites, O., Rhee, J.S., Schwarz, M., Rosenmund, C., and Jahn, R. (2004). Reinvestigation of the role of snapin in neurotransmitter release. *J. Biol. Chem.* 279, 26251–26256.
- Wang, H., Tang, X., Liu, J., Trautmann, S., Balasundaram, D., McCollum, D., and Balasubramanian, M.K. (2002). The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* 13, 515–529.
- Wilson, G.M., Fielding, A.B., Simon, G.C., Yu, X., Andrews, P.D., Hames, R.S., Frey, A.M., Peden, A.A., Gould, G.W., and Prekeris, R. (2005). The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* 16, 849–860.
- Yeaman, C. (2003). Ultracentrifugation-based approaches to study regulation of Sec6/8 (exocyst) complex function during development of epithelial cell polarity. *Methods* 30, 198–206.
- Yeaman, C., Grindstaff, K.K., and Nelson, W.J. (2004). Mechanism of recruiting Sec6/8 (exocyst) complex to the apical junctional complex during polarization of epithelial cells. *J. Cell Sci.* 117, 559–570.

Deuxième partie

Etude des conséquences de la perturbation de la mitose sur
la prolifération cellulaire

5 Résultats et discussion II : étude des conséquences de la perturbation de la mitose sur la prolifération cellulaire

5.1 Présentation du sujet

L'instabilité chromosomique et l'aneuploïdie sont caractéristiques de la plupart des cancers, dont 85 % des cancers colorectaux (Lengauer, Kinzler et al. 1997; Lengauer, Kinzler et al. 1998). L'aneuploïdie observée dans un grand nombre de cancers est corrélée avec des tumeurs agressives et un mauvais pronostic de survie. Malgré l'association fréquente entre l'instabilité chromosomique, l'aneuploïdie et le processus de cancérogénèse, une relation de causalité n'a pas été mise en évidence (Geigl, Obenauf et al. 2008). Ainsi, on ignore si l'aneuploïdie d'une cellule, résultant d'un accident lors de la mitose, est un élément suffisant susceptible de transformer une cellule.

Le déroulement de la mitose chez les eucaryotes supérieurs est soumis à un point de contrôle dit point de contrôle du fuseau mitotique (Musacchio and Salmon 2007). Ce point de contrôle est actif tant que les chromosomes ne sont pas tous alignés sur la plaque métaphasique et rattachés via les kinétochores à des microtubules kinétochoriens, ou fibres kinétochoriennes, dont la dynamique est suffisante pour assurer la séparation des chromosomes en deux chromatides. L'activité du point de contrôle permet de retarder l'anaphase jusqu'à ce que toutes les conditions au bon déroulement de la mitose soient réunies.

Ce point de contrôle n'est pas absolu. Lorsque le fuseau mitotique est dépolymérisé par des inhibiteurs des microtubules, le point de contrôle est activé et les cellules s'arrêtent en métaphase. Après un certain passé en métaphase, les cellules peuvent échapper au point de contrôle et sortir de mitose sans pour autant avoir séparé leur ADN ni s'être clivée en deux cellules filles (Andreassen and Margolis 1994; Andreassen, Martineau et al. 1996). Les cellules tétraploïdes résultantes sont incapables de poursuivre un cycle cellulaire normal et restent arrêtées en pseudo-phase G1 (Andreassen, Lohez et al. 2001). Ce phénomène a reçu le nom de «*mitotic slippage*», et l'arrêt résultant celui de «*post-mitotic checkpoint*». On sait peut de choses

sur les conditions du *mitotic slippage*, néanmoins, il a été montré que dans les cellules qui sortent de mitose de cette façon, la Cycline B est dégradée. Dans les cellules qui surexpriment une version non dégradable de la Cycline B, le *mitotic slippage* ne se produit pas, les cellules restant arrêtées en métaphase (Brito and Rieder 2006). Il semble que le phénomène du mitotic slippage se produise en dépit d'un point de contrôle mitotique activé. En effet, les protéines du point de contrôle mitotique sont retrouvées localisées sur les kinétochores des cellules tétraploïdes arrêtées en début de phase G1, ce qui est un signe de l'activation des protéines du point de contrôle (Rieder, Cole et al. 1995). Par ailleurs, il semble que les cellules qui sortent de mitose par mitotic slippage aient un métabolisme différent des cellules qui sortent de mitose après avoir satisfait le point de contrôle. On retrouve en effet dans les cellules arrêtées par le post-mitotic checkpoint des substrats du complexe APC/C-Cdh1 spécifiques de la sortie de mitose non dégradés. Cela pourrait signifier que dans ces cellules, APC/C-Cdh1 est inactif (Brito and Rieder 2006).

Au cours des années qui ont précédé le début de ces travaux, un certain nombre de publications ont mis en évidence l'importance de la dynamique des microtubules dans le bon déroulement de la mitose. C'est en effet grâce à des inhibiteurs de la dynamique des microtubules que l'on a pu étudier le point de contrôle mitotique chez la levure puis chez l'homme (Hoyt, Totis et al. 1991). Les inhibiteurs des microtubules sont utilisés pour synchroniser les populations de cellules en culture parce qu'ils permettent d'activer le point de contrôle mitotique mais n'entravent pas le déroulement du cycle cellulaire en interphase. Parmi les inhibiteurs de la dynamique de microtubules on trouve des inhibiteurs de la polymérisation, comme par exemple le nocodazole et la vinblastine, et des inhibiteurs de la dépolymérisation comme le taxol (Jordan and Wilson 2004). Les premières publications concernant le point de contrôle mitotique ont mis en avant l'importance de l'attachement des microtubules aux kinétochores en utilisant le nocodazole à des concentrations qui entraînaient une dépolymérisation complète du fuseau mitotique (Rieder, Schultz et al. 1994). A de plus faibles concentrations, tous les inhibiteurs des microtubules affectent la dynamique des microtubules de façon similaire et perturbent la mise en place du fuseau mitotique sans pour autant le dépolymériser complètement (Jordan, Thrower et al. 1992). L'utilisation de ces concentrations moins importantes a permis de montrer plus récemment que la dynamique des microtubules est aussi importante pour la mise en place d'un fuseau mitotique normal et le positionnement des

chromosomes ainsi que pour le fonctionnement correct du point de contrôle mitotique (Wendell, Wilson et al. 1993; Skoufias, Andreassen et al. 2001). En 2001, Cimini et Salmon ont montré qu'en utilisant le nocodazole selon un protocole particulier ils pouvaient induire une augmentation spécifique des chromosomes mérotéliques en mitose ainsi qu'une augmentation de cellules aneuploïdes résultant de ces défauts (Cimini, Howell et al. 2001).

Pendant ma thèse je me suis intéressée aux conséquences des anomalies de la mitose sur la prolifération des cellules. Nous avons fait l'hypothèse que les cellules aneuploïdes résultant de mitoses anormales sont susceptibles de déclencher un mécanisme de contrôle qui permette d'empêcher leur prolifération.

Afin d'étudier la prolifération de cellules avec le moins de mutations ou de modifications possibles nous avons travaillé préférentiellement avec les cellules REF52, des fibroblastes primaires de rat, et les cellules IMR90, une lignée de cellules primaires de fibroblastes humains. Ces cellules ne sont pas transformées et possèdent à priori tous leurs points de contrôle intacts.

Pour obtenir des cellules aneuploïdes, nous avons décidé d'utiliser des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules. Nous avons utilisé des concentrations permettant d'affecter l'établissement du fuseau mitotique et le déroulement de la mitose de façon à créer des défauts de ségrégation des chromosomes, sans dépolymériser le fuseau complètement.

6 Résultats

6.1 Validation du modèle

Dans un premier temps nous avons tenu à vérifier que notre modèle de travail était viable, c'est à dire que l'on peut générer des cellules aneuploïdes en utilisant des inhibiteurs des microtubules pour modifier le déroulement de la mitose. La première étape a consisté à trouver

les concentrations d'inhibiteurs susceptibles de produire l'effet désiré, puis nous avons étudié plus précisément le comportement des cellules traitées avec ces concentrations particulières.

6.1.1 Etude de l'effet de différentes concentrations d'inhibiteurs de la polymérisation des microtubules sur le contenu des cellules en ADN.

Afin d'évaluer l'effet potentiel des inhibiteurs de microtubules sur la ploïdie des cellules, nous avons utilisé la mesure de la quantité de l'ADN par cytométrie de flux. La cytométrie de flux permet à la fois d'analyser des marqueurs dans chaque cellule individuellement et d'obtenir des données concernant toute une population de cellules. La présence de cellules aneuploïdes peut être suggérée par un élargissement du pic correspondant à 2N chromosomes, du fait de la présence de cellules comprenant quelques chromosomes de plus ou de moins que la stricte ploïdie. A partir d'une certaine concentration de nocodazole dans le milieu, le fuseau de microtubules est complètement dépolymérisé et les cellules s'arrêtent en mitose par activation du point de contrôle mitotique. Les cellules sortant de mitose via « *mitotic slippage* » sont tétraploïdes. La tétraploïdie est facilement analysée par cytométrie de flux en mesurant la quantité d'ADN par cellule, les cellules tétraploïdes formant un pic correspondant à 4N chromosomes.

Les cellules REF52 ont été cultivées en présence d'une gamme de concentrations de nocodazole pendant 24 heures, puis récoltées et fixées, enfin l'ADN a été marqué et les différents échantillons ont été analysés. Les résultats de cette première expérience sont présentés figure 1.

On observe avec la figure 1 que dans le cas des REF52, les cellules sont tétraploïdes à partir de 133 nM de nocodazole dans le milieu de culture. A des concentrations inférieures à 133 nM, on note que les cellules ne s'accumulent pas selon un pic correspondant à 4N chromosomes, mais plutôt que les cellules se répartissent entre deux populations autour des valeurs 2N et 4N chromosomes. On retrouve à 83 nM de nocodazole un pic 2N élargi comme nous en avons fait l'hypothèse, cette population correspondant probablement à des cellules

aneuploïdes. La coexistence de deux populations de cellules différentes (tétraploïdes et aneuploïdes) pourrait s'expliquer par une certaine différence de sensibilité aux inhibiteurs entre les cellules d'une même population.

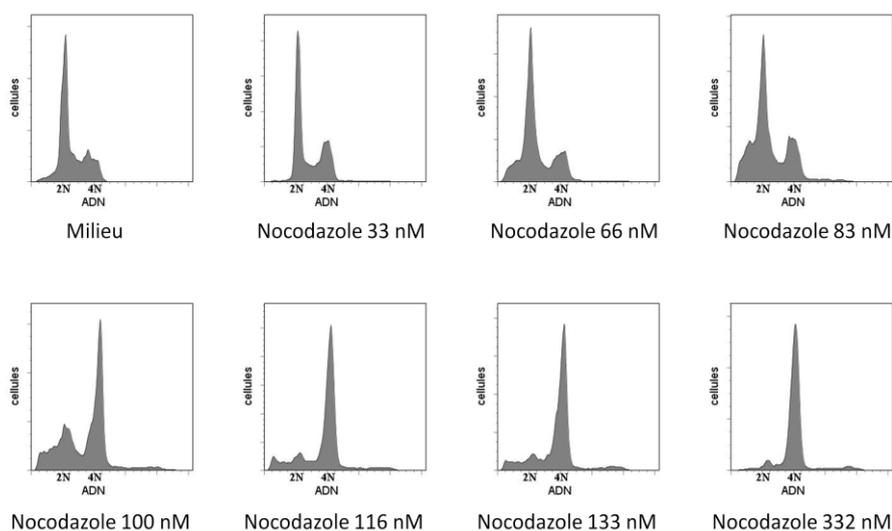


Figure 1 : Le nocodazole modifie la répartition de l'ADN dans les REF52

Les cellules REF52 asynchrones ont été cultivées dans du milieu ou en présence de différentes concentrations de nocodazole pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées et fixées, et leur ADN a été marqué par iodure de propidium. Les graphes représentent le nombre de cellules en fonction de leur contenu en ADN.

A des concentrations de nocodazole inférieures à 66 nM, la différence entre le contrôle et les cellules traitées n'apparaît pas nettement en cytométrie de flux. Cela n'exclut pas que le nocodazole induise des défauts de ploïdie de l'ordre d'un chromosome manquant ou surnuméraire. Néanmoins, pour la suite des travaux, nous avons préféré utiliser une concentration qui nous donne un phénotype plus facilement observable en cytométrie de flux.

J'ai réalisé la même expérience avec deux autres inhibiteurs de la polymérisation des microtubules, le taxol et la vinblastine. Les résultats de ces expériences sont présentés figure 2. Comme pour le nocodazole, l'utilisation d'une gamme de concentrations de ces deux composés pendant 24 heures dans le milieu de culture des REF52 modifie la répartition de la quantité de l'ADN dans les cellules. Cela semble signifier, comme pour le nocodazole, que dans ces

conditions particulières la ségrégation des chromosomes est asymétrique. Dans toutes les expériences, on note que la répartition entre une population aneuploïde et tétraploïde dépend de la concentration utilisée, et non de la nature de l'inhibiteur.

Dans le cas du taxol, on obtient un pic élargi à une concentration de 40 nM, puis avec l'augmentation de la concentration d'inhibiteur, les cellules contenant 4N chromosomes tendent à s'accumuler, jusqu'à la concentration de 80 nM où les cellules sont très majoritairement tétraploïdes.

Dans le cas de la vinblastine, le pic 2N est plus large dès 2 nM d'inhibiteur, et les cellules sont majoritairement tétraploïdes lorsque l'on utilise 20 nM. Entre ces deux concentrations, comme pour le nocodazole et le taxol, les cellules se départagent entre deux populations: aneuploïdes et tétraploïdes, et le rapport de ces deux populations évolue avec la concentration en inhibiteur.

Par la suite, pour générer des cellules REF52 aneuploïdes à partir de nocodazole ou de vinblastine j'ai utilisé les concentrations me permettant d'obtenir un pic visiblement élargi et un minimum de cellules tétraploïdes. Pour les expériences suivantes impliquant des REF52, et à chaque fois que je mentionne l'effet de faibles concentrations d'inhibiteurs, j'ai utilisé le nocodazole à la concentration de 83 nM, la vinblastine à la concentration de 2,5 nM et le taxol à 40 nM.

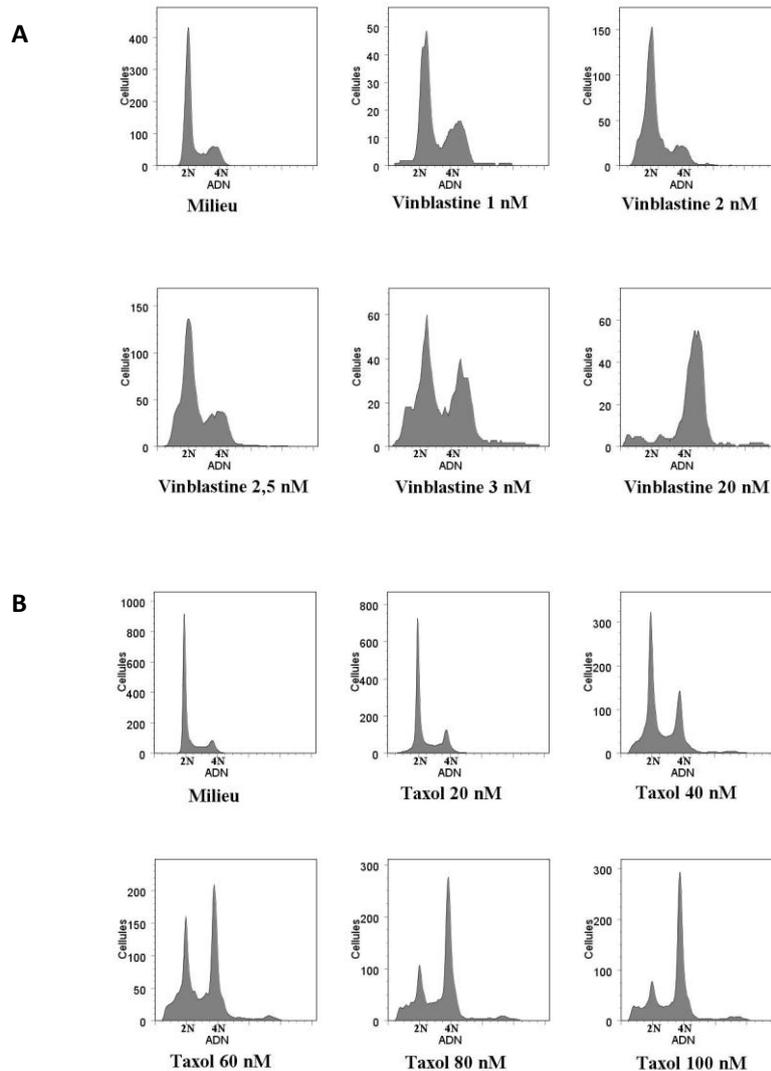


Figure 2 : La vinblastine et le taxol modifient la répartition de l'ADN dans les REF52

Les cellules REF52 asynchrones ont été cultivées dans du milieu normal ou en présence d'une gamme de concentrations soit de vinblastine (figure 2A) soit de taxol (figure 2B) pendant 24 heures. Les cellules ont ensuite été récoltées et fixées, et leur ADN a été marqué pour être analysé en cytométrie de flux. Les graphes représentent le nombre de cellules en fonction de leur contenu en ADN.

6.1.2 En présence de faibles doses d'inhibiteur, les cellules traversent la mitose de façon anormale.

Pour vérifier que les conditions d'utilisation des inhibiteurs de la polymérisation des microtubules établies précédemment créent des cellules aneuploïdes nous avons observé les cellules en microscopie de fluorescence. Nous avons tout d'abord observé les types de défauts obtenus en mitose en présence des doses d'inhibiteur sélectionnées, puis nous avons cherché à évaluer la proportion de cellules présentant des défauts dans les conditions expérimentales.

Comme nous nous intéressons à la ségrégation des chromosomes, nous avons dans un premier temps observé des cellules préalablement synchronisées, puis incubées dans du milieu contenant soit du nocodazole soit de la vinblastine aux concentrations induisant les pics élargis décrits précédemment (83 nM pour le nocodazole et 2,5 nM pour la vinblastine), et fixées à différents moments de la mitose déterminée par évaluation de l'index mitotique. Les marquages de l'ADN et de la Tubuline- α permettent d'observer à la fois le fuseau mitotique et les chromosomes. Des images représentatives de ces expériences sont présentées dans les figures 3 à 6.

Dans les cellules cultivées sans inhibiteurs, on n'observe pas de défauts apparents (voir figure 3). Par contre, on observe des anomalies diverses en mitose en présence d'inhibiteurs de la dynamique des microtubules, et ce quelque soit l'inhibiteur employé. On remarque deux défauts majeurs : la présence de fuseaux mitotiques multipolaires et la présence, autour de certains pôles des fuseaux, de chromosomes non alignés. Ces deux types de défauts sont susceptibles d'entraîner une ségrégation anormale des chromosomes. Les cellules présentant des fuseaux multipolaires peuvent avoir plusieurs pôles distincts (figure 5a) ou bien un fuseau mitotique auquel se rajoute d'autres pôles ressemblant à des asters (figure 5b et figure 4e et 4f). Dans les cellules qui présentent ces asters on retrouve très fréquemment des chromosomes au voisinage des pôles du fuseau principal. On observe aussi des chromosomes non alignés dans des cellules contenant un fuseau bipolaire (figures 4a, 4b, 4d et 6a).

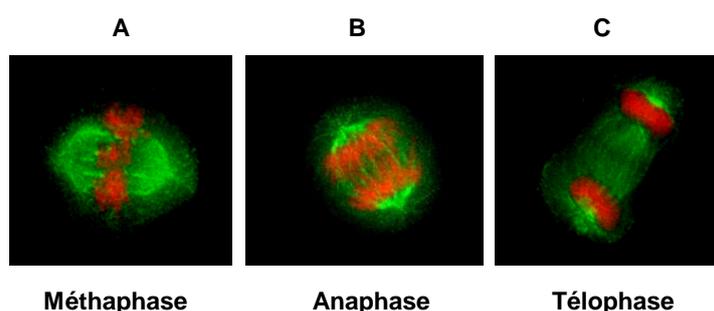


Figure 3 : Déroulement d'une mitose normale.

Les cellules REF52 ont été cultivées sur lamelles recouvertes de poly-lysine en absence d'inhibiteur. On observe que les chromosomes se regroupent sur la plaque métaphasique en métaphase (A), puis les chromatides se séparent en deux pools lors de l'anaphase (B). En téléphase, les deux pools de chromosomes sont attirés vers les pôles du fuseau et on n'observe pas de pont chromosomiques ou de chromosome isolé. La Tubuline- α est en vert, l'ADN en rouge

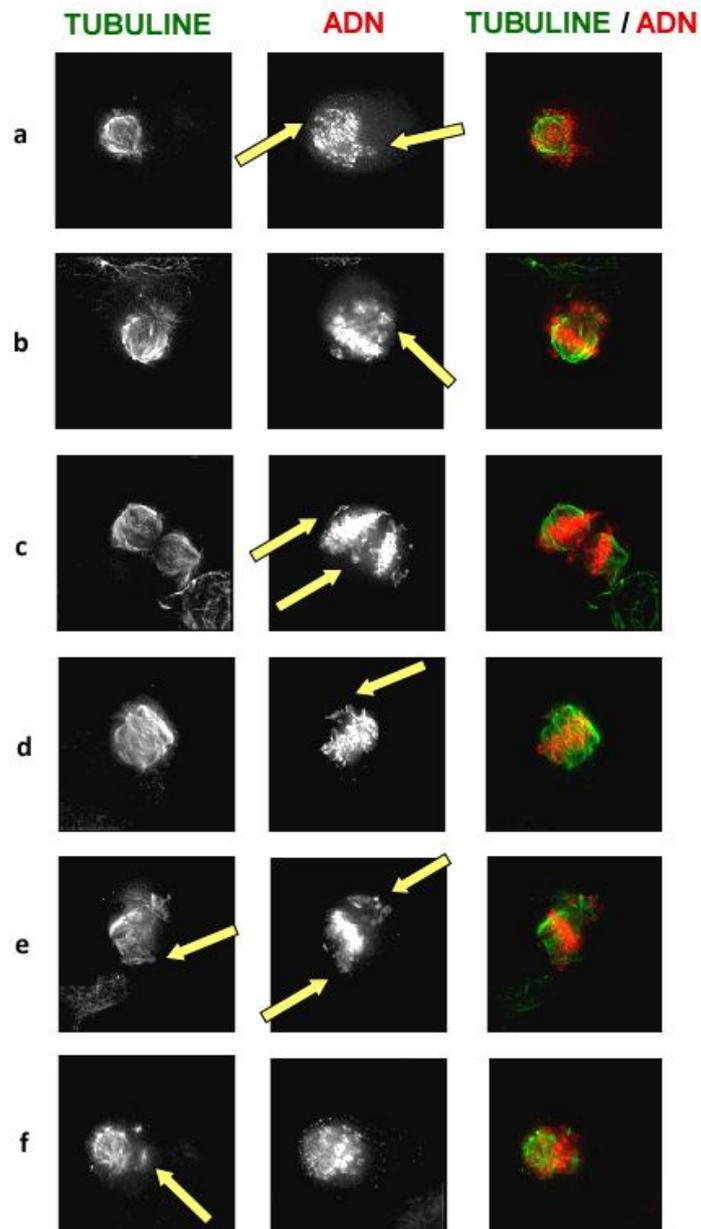


Figure 4 : Le nocodazole entraîne différents types de défauts en mitose.

Les cellules REF52 cultivées sur des lamelles recouvertes de poly-lysine, ont été synchronisées en phase S par traitement avec de l'aphidicoline. Les cellules ont ensuite été cultivées en présence de 83 nM de nocodazole. Les cellules ont été fixées lors de la mitose. Les différents types de marquages utilisés sont précisés dans la couleur de l'anticorps secondaire ou du fluorophore correspondant. Tubuline : Tubuline- α . Les flèches désignent les chromosomes non alignés ou les pôles surnuméraires.

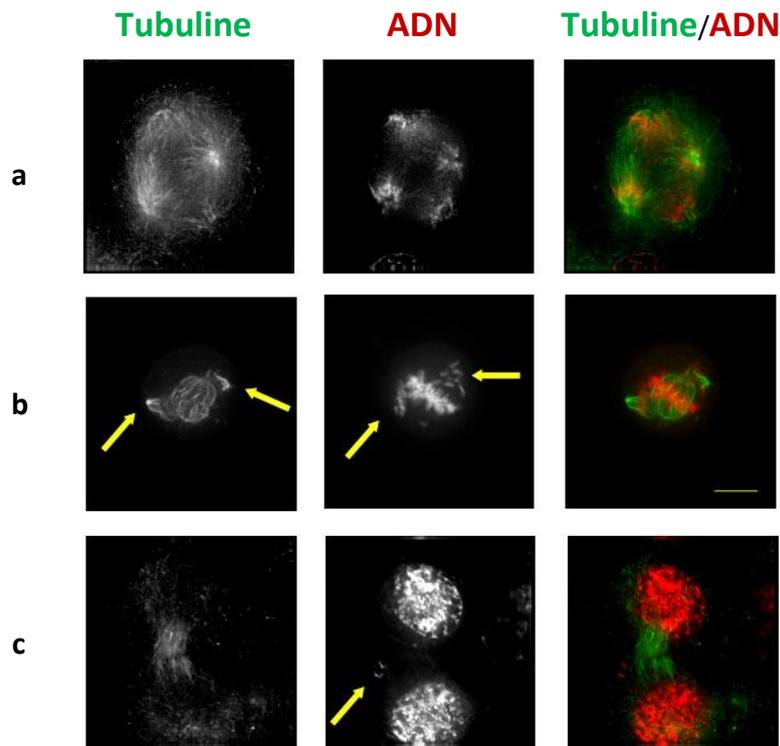


Figure 5 : La vinblastine entraîne différents types de défauts en mitose.

Dans le cas des cellules en présence de faibles concentrations de nocodazole ou de vinblastine, le cytosquelette de microtubule semble assez dynamique pour permettre la mise en place du fuseau central et assurer les étapes finales de la division malgré présence d'anomalies. On observe en effet des cellules multipolaires en anaphase, ainsi que des cellules qui opèrent la ségrégation de leurs chromosomes de façon asymétrique (figure 5a). On note que les groupes de chromosomes se séparent, que des fuseaux centraux se forment et que les cellules atteignent la télophase (figure 5c et 6b). On retrouve notamment des cellules en télophase présentant des anomalies, avec par exemple des chromosomes non alignés. Les cellules résultant de telles mitoses forment des cellules contenant des micronoyaux en interphase (figure 6c). Ces micronoyaux sont visibles dès la cytokinèse, où l'ADN se décondense et la membrane nucléaire se reforme.

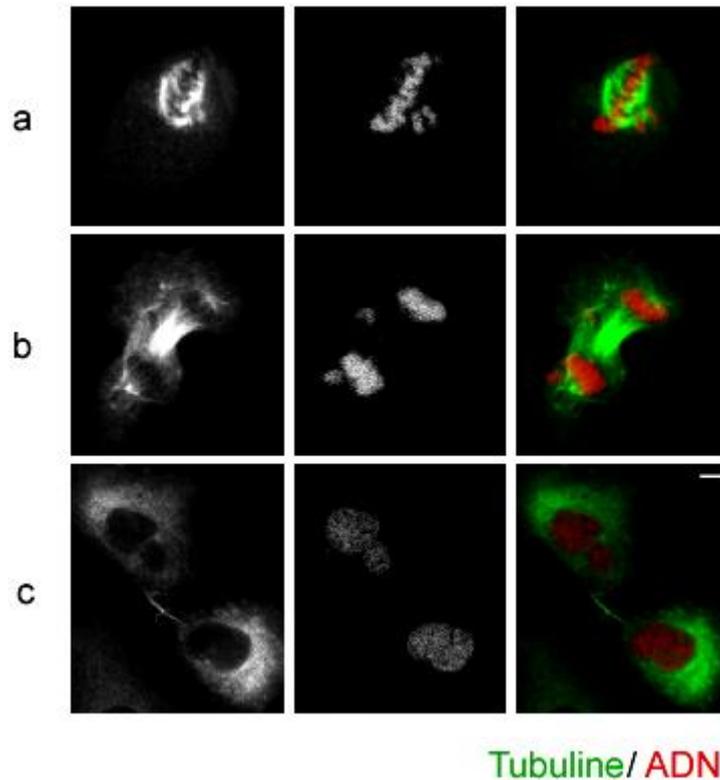


Figure 6 : Les cellules traversent la mitose avec des anomalies.

Les cellules REF52 ont été cultivées dans les mêmes conditions que celles de la figure 3, en présence de nocodazole. Les différents types de marquages utilisés sont précisés dans la couleur de l'anticorps secondaire ou du fluorophore correspondant. Tubuline : Tubuline- α . Les cellules présentent des anomalies en métaphase (a), télophase (b), ou en cytokinèse (c).

Ces expériences nous ont permis d'observer deux aspects importants de la façon dont les cellules REF52 se divisent en présence de faibles doses de nocodazole et de vinblastine. Le premier aspect est la présence de défauts au niveau du fuseau mitotique, entraînant des défauts de ségrégation divers. Le deuxième aspect est le fait que les cellules semblent néanmoins progresser en suivant toutes les phases classiquement décrites de la mitose. Ce deuxième point nous a conduit à poser la question de savoir si le point de contrôle mitotique dans les REF52 est fonctionnel et s'il est activé dans le cadre de nos expériences.

Afin de savoir si le point de contrôle est fonctionnel dans les cellules en présence de faibles concentrations d'inhibiteur, nous avons vérifié que la protéine Bub1 se localise effectivement sur les kinétochores non attachés ou non alignés, comme décrit dans la littérature (Rieder, Schultz et al. 1994; Taylor and McKeon 1997; Skoufias, Andreassen et al. 2001).

L'activation du point de contrôle mitotique dans le cas de manque de tension aux kinétochores nécessite la localisation de Bub1 sur les sites défectueux. L'observation de la localisation de Bub1 en début de mitose nous a permis d'établir que cette protéine se localise bien sur les kinétochores des chromosomes non alignés, ce qui signifie que les défauts de tension sont correctement pris en compte par les molécules du point de contrôle mitotique (figure 7).

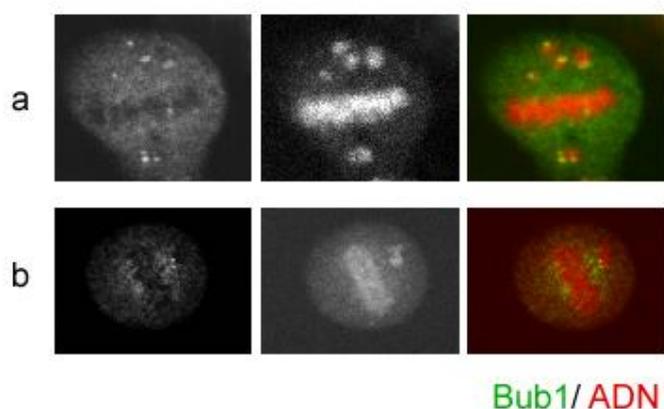


Figure 7 : Dans les cellules REF52, Bub1 se localise correctement.

Les cellules REF52 sont cultivées sur des lamelles recouvertes de poly-lysine en présence de 83 nM de nocodazole. Les cellules ont été fixées après 8 heures d'incubation. Les différents types de marquages utilisés sont précisés dans la couleur de l'anticorps secondaire ou du fluorophore correspondant. Dans les deux situations, Bub1 se localise sur les chromosomes non alignés, comme reporté dans la littérature (Rieder, Cole et al. 1995; Taylor and McKeon 1997; Skoufias, Andreassen et al. 2001).

Afin de savoir si le point de contrôle est activé en présence de faibles concentrations d'inhibiteurs, nous avons vérifié que les cellules étaient ralenties ou arrêtées en mesurant le temps passé en mitose. Pour cela nous avons mesuré par cytométrie de flux l'évolution du niveau d'antigène MPM2 au cours de la mitose dans les cellules préalablement synchronisées en phase S. L'antigène MPM2 est un phospho-épitope retrouvé sur de nombreuses protéines spécifiquement durant la mitose et qui disparaît progressivement après la transition métaphase/anaphase (Kuang, Zhao et al. 1989). Les résultats de ces expériences sont présentés figure 8.

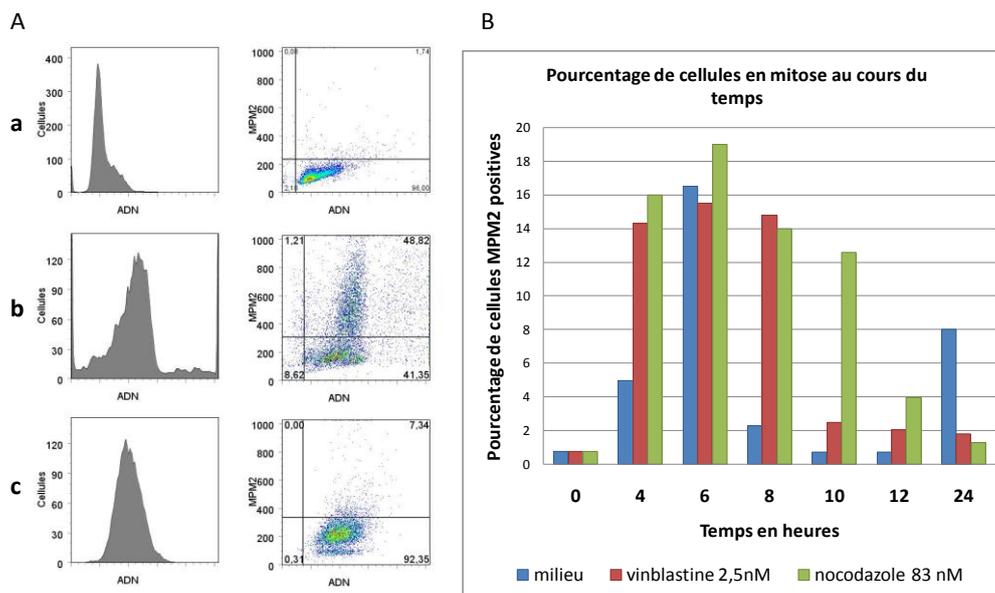


Figure 8 : La sortie de mitose est retardée en présence d'inhibiteur.

A : Exemple de profils du marquage MPM2 dans différentes conditions.

(a) Les cellules synchronisées avec 5µM d'aphidicoline pendant 16 heures sont bloquées en phase S. Le profil correspondant à l'ADN dessine un pic centré autour de la valeur 2N, les cellules n'ayant pas encore dupliqué leur ADN (colonne de gauche). Les cellules ne contiennent pas encore le phospho-épitope MPM2, comme le montre la figure correspondante à droite. (b) En présence de fortes concentrations de nocodazole (332 nM) pendant 8 heures après lavage de l'aphidicoline, une grande partie des cellules est tétraploïde (gauche) et le signal MPM2 est très important (droite). Il s'agit donc de cellules en mitose. (c) Après 12 heures dans 332 nM de nocodazole, les cellules restent tétraploïdes (gauche) mais le phospho-épitope a disparu, preuve que les cellules ne sont plus en mitose mais en pseudo-G1.

B : Evolution de la quantité de MPM2 dans les cellules cultivées en présence d'inhibiteur.

Les cellules REF52 ont été synchronisées en phase S avec de l'aphidicoline (5µM pendant 16 heures), l'aphidicoline a été éliminée du milieu et les cellules ont été incubées dans du milieu contenant différents inhibiteurs. Le graphe représente le pourcentage de cellules MPM2 positives à chaque point de collection des échantillons (de 4 heures à 24 heures après élimination de l'aphidicoline)

Les cellules incubées dans de faibles concentrations soit de nocodazole soit de vinblastine mettent plus de temps que les cellules contrôles à sortir de mitose (figure 8B). Les cellules contrôles sortent de mitose 8 heures après le lavage de l'aphidicoline. Les cellules cultivées en présence de vinblastine sortent de mitose 2 heures plus tard, et les cellules cultivées en présence de nocodazole 4 heures plus tard. On peut observer sur le graphe que les cellules contrôles présentent à nouveau une proportion importante de cellules en mitose 24 heures après rinçage de l'aphidicoline, ce qui montre qu'elles ont entamé un nouveau cycle.

Le délai observé dans la durée de la mitose permet d'avancer que le point de contrôle est probablement activé mais qu'il ne suffit pas à arrêter les cellules en métaphase. Il est particulièrement intéressant de noter que malgré des défauts nombreux et variés, et bien qu'elles disposent d'un point de contrôle intact, les cellules traversent les différentes étapes de la mitose en présence d'anomalies. Ce phénotype est donc différent du *mitotic slippage* que l'on observe dans le cas de cellules en présence de fortes doses de nocodazole et qui conduit à des cellules tétraploïdes arrêtées en pseudo G1.

Afin de savoir quelle est la proportion de cellules aneuploïdes obtenues selon notre protocole, nous avons quantifié le nombre de cellules contenant des fuseaux multipolaires lors de la mitose. Pour cela nous avons cultivé des cellules REF52 en présence soit de 83 nM de nocodazole soit de 2,5 nM de vinblastine dans le milieu de culture, sans synchronisation préalable. Après 8 heures en présence d'inhibiteur, les cellules étaient fixées et marquées comme précédemment. Les résultats sont présentés figure 9.

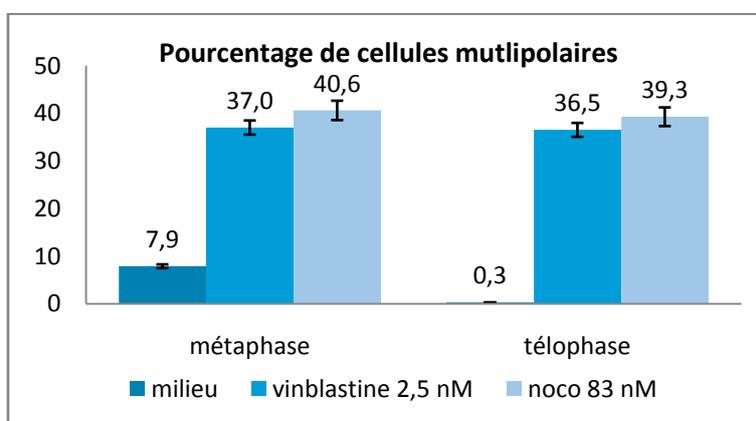


Figure 9 : Evaluation de la proportion de cellules aneuploïdes dans la population.

Les cellules REF52 ont été cultivées en présence de 83 nM de nocodazole ou de 2,5 nM de vinblastine pendant 8 heures puis fixées. Les cellules en mitose ont été classées selon le nombre de pôles du fuseau mitotique. Les cellules contenant des asters ont été considérées comme multipolaires. Ces données représentent trois expériences indépendantes. Pour le milieu : n=272 (métaphase) et n=202 (télophase), pour la vinblastine : n=239 (métaphase) et n=201, pour le nocodazole : n=284 (métaphase) et n=198 (télophase).

Cette expérience nous a permis d'établir qu'une proportion importante de cellules, lorsqu'elles sont cultivées en présence de faibles concentrations d'inhibiteurs, présentent des fuseaux multipolaires en métaphase. Tandis que les populations de REF52 cultivées dans du milieu contiennent 7,9% de cellules ayant des fuseaux multipolaires en métaphase, les REF52 cultivées dans 83nM de nocodazole présentent des fuseaux multipolaires dans 40,6% des cas en métaphase. Les cellules cultivées dans 2,5 nM de vinblastine présentent des fuseaux multipolaires dans 37% des cas en métaphase. Cette différence s'accroît après le passage de la métaphase à l'anaphase. La baisse des anomalies observée dans les cellules contrôle est due à un mécanisme de réparation des erreurs dans lequel les protéines MCAK et Aurora B joueraient un rôle prépondérant (Kline-Smith, Khodjakov et al. 2004; Lan, Zhang et al. 2004). En présence de nocodazole ou de vinblastine, même à de faibles concentrations, la dynamique des microtubules est affectée, et il est possible que les protéines responsables de la réparation des erreurs de liaison des kinétochores aux microtubules ne peuvent fonctionner normalement dans ces conditions. Ainsi, non seulement les inhibiteurs empêchent la mise en place d'un fuseau de microtubule bipolaire suffisamment dynamique, mais qui plus est, ils empêchent aussi le bon fonctionnement des divers mécanismes de réparation des erreurs.

Ces expériences nous ont permis de déterminer que, aux doses choisies, le nocodazole et la vinblastine nous permettent de provoquer des défauts de ségrégation des chromosomes pendant la mitose et génèrent une population de cellules en phase G1 qui sont majoritairement aneuploïdes. Nous avons donc pu continuer notre projet et observer le comportement de ces cellules aneuploïdes, particulièrement leur prolifération.

6.2 Etude de la prolifération des cellules aneuploïdes

Nous avons voulu savoir si les cellules traitées avec du nocodazole ou de la vinblastine continuent de cycler après avoir traversé une mitose anormale.

Pour cela, nous avons utilisé à nouveau des cellules REF52. Ces cellules ont été cultivées pendant 24 heures dans différentes concentrations de nocodazole, ce qui a permis de former

des cellules aneuploïdes et tétraploïdes selon la concentration utilisée. Une partie de ces cellules a été fixée, afin de pouvoir être analysée et servir de contrôle par la suite. Dans l'autre partie des cellules, les inhibiteurs utilisés ont été éliminés par rinçages successifs, puis les cellules ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires dans du milieu contenant 332 nM de nocodazole, afin de synchroniser les cellules en mitose.

Si les cellules aneuploïdes qui forment en cytométrie ce flux un pic 2N élargi sont des cellules qui ont la capacité de proliférer, alors elles vont dupliquer leurs chromosomes et former, après les 24 heures supplémentaires en présence d'une forte dose de nocodazole, un pic 4N probablement élargi lui aussi. Si les cellules aneuploïdes sont, comme les cellules tétraploïdes après *mitotic slippage*, bloquées en phase G1, la répartition de leur ADN ne sera pas modifiée par l'ajout de nocodazole à forte dose. Les résultats de cette expérience sont présentés figure 10.

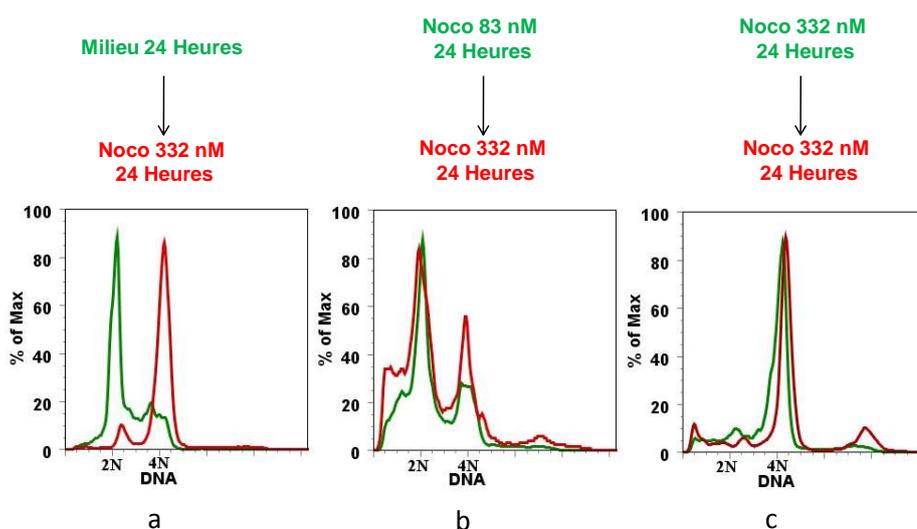


Figure 10 : Les cellules REF52 aneuploïdes et tétraploïdes restent arrêtées en phase G1.

Les cellules REF52 asynchrones ont été cultivées dans du milieu normal ou en présence de 83 nM ou de 332 nM de nocodazole pendant 24 heures (profils correspondants aux graphes verts). Les inhibiteurs ont ensuite été éliminés par rinçages successifs avec du PBS. Les cellules ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires dans du milieu contenant 332 nM de nocodazole (profils correspondants aux graphes rouges). Tandis que les cellules contrôles progressent et dupliquent leur ADN, le profil des cellules aneuploïdes ou tétraploïdes ne change pas, ce qui signifie que ces cellules ne prolifèrent plus et sont arrêtées en phase G1 ou pseudo-G1.

Les résultats de cette expérience mettent clairement en évidence que la grande majorité des cellules aneuploïdes obtenues par traitement avec du nocodazole ne prolifèrent pas (figure 10b), tout comme les cellules tétraploïdes après *mitotic slippage* (figure 10c). On note que les cellules aneuploïdes ne répliquent pas leur ADN et qu'une grande majorité d'entre elles reste arrêtée en phase G1. Une faible partie de la population semble cependant dupliquer son ADN et donc continue de proliférer (figure 10b).

Afin de confirmer ces résultats par un protocole expérimental différent, nous avons observé la prolifération relative de cellules cultivées en présence de nocodazole ou de vinblastine en mesurant l'intégration de Bromodoxyuridine, ou BrdU, dans l'ADN en cours de réplication. Le principe de cette méthode repose sur la capacité des cellules à utiliser le BrdU, un analogue de la thymidine, lorsqu'elles synthétisent de l'ADN. Le BrdU est incorporé à la place de la Thymidine dans l'ADN nouvellement synthétisé, puis la présence de BrdU dans les cellules est révélée par immunomarquage et mesurée par cytométrie de flux. Ce marquage permet d'évaluer quelle est la proportion de cellules qui répliquent leur ADN, et donc qui sont entrées en phase S, pendant le temps donné de l'incubation, et dans les conditions expérimentales.

Des cellules REF52 ont été cultivées en présence d'inhibiteurs de la polymérisation des microtubules afin d'obtenir des cellules aneuploïdes et tétraploïdes. Après 24 heures et 48 heures en présence d'inhibiteurs, les cellules ont été mises en présence de BrdU pendant 2 heures, puis lavées et fixées. Les résultats sont présentés figure 11.

Comme le montre la figure 11, les cellules traitées avec les concentrations les plus fortes d'inhibiteurs des microtubules cessent de proliférer dès lors qu'elles sont devenues tétraploïdes. En effet, les cellules tétraploïdes, qu'elles aient été cultivées en présence de nocodazole ou bien de vinblastine, n'incorporent du BrdU que dans 5% des cas, quand dans le même temps, 43% des cellules contrôles incorporent du BrdU. Si l'on observe l'échantillon correspondant aux cellules traitées avec de fortes concentrations d'inhibiteurs mais récoltées après 48 heures, on observe un pourcentage de cellules qui incorporent du BrdU encore plus faible. Il est possible qu'un certain nombre de cellules tétraploïdes ne s'arrêtent pas en phase G1, néanmoins une fois que ces cellules sont devenues polyploïdes (8N chromosomes après réplication de l'ADN), on n'observe pas d'incorporation de BrdU.

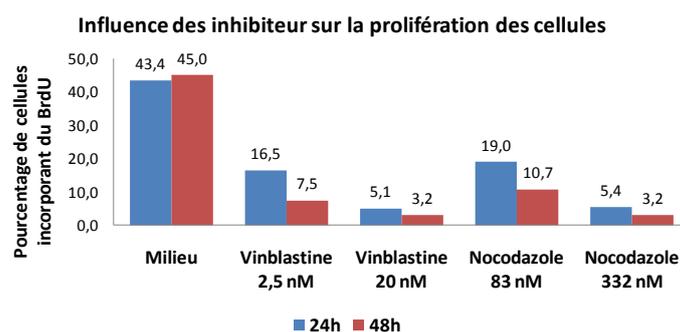
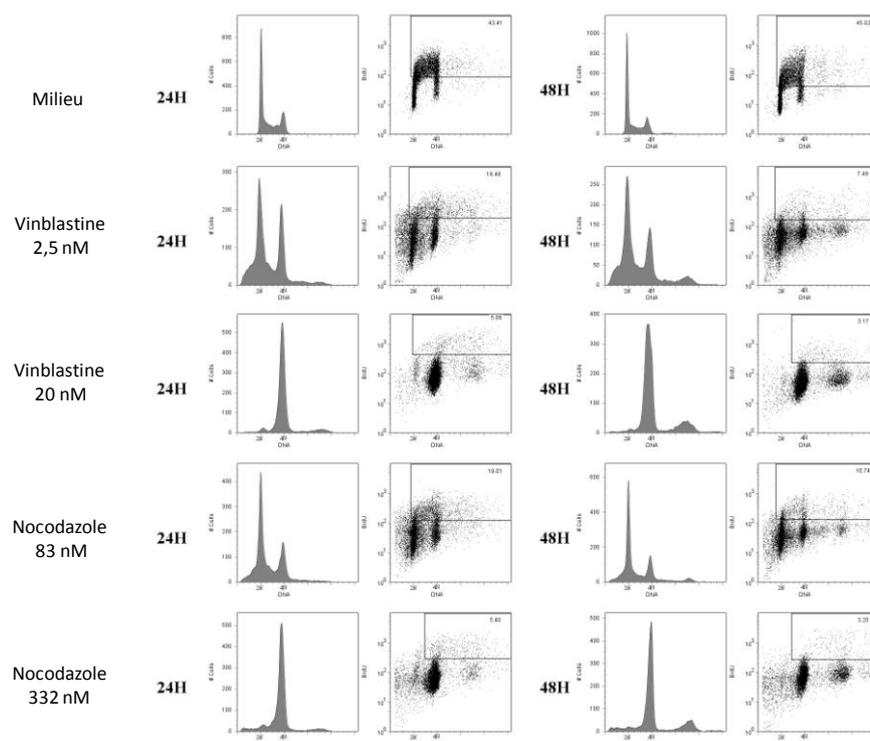


Figure 11 : Les cellules REF52 aneuploïdes et tétraploïdes ne prolifèrent pas.

Les cellules REF52 asynchrones ont été cultivées dans du milieu normal ou en présence de vinblastine (2,5 nM ou 20 nM) ou nocodazole (83 nM ou 332 nM) pendant 24 et 48 heures. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 heures supplémentaires dans les mêmes milieux additionnés de Bromo-desoxyUridine. Les cellules ont été fixées et la quantité de BrdU évaluée par immunomarquage et cytométrie de flux. Tandis que les cellules contrôles progressent et dupliquent leur ADN, les cellules aneuploïdes (vinblastine 2,5 nM ou nocodazole 83 nM) incorporent beaucoup moins de BrdU, ce qui signifie qu'une grande partie de ces cellules ne prolifère plus et reste arrêtée en phase G1 ou pseudo-G1. La baisse du taux d'incorporation de BrdU dans les cellules aneuploïdes après 48 heures confirme qu'une partie des cellules qui proliféraient encore après 24 heures de traitement est arrêtée. Les cellules tétraploïdes (vinblastine 20 nM ou nocodazole 332 nM) sont très majoritairement arrêtées en phase G1 ou pseudo-G1 après 24 heures de traitement. Les pourcentages de cellules ayant intégré du BrdU pour chaque condition sont présentés dans le diagramme.

Les cellules cultivées en présence de faibles concentrations d'inhibiteurs de la polymérisation des microtubules progressent nettement moins que les cellules de la population contrôle (cellules cultivées dans du milieu sans inhibiteur) après 24 heures de traitement. Après 48 heures en présence d'inhibiteur, le nombre de cellules qui progressent en phase S est deux fois moins important qu'après 24 heures de traitement. Aux deux temps considérés, 24 heures et 48 heures, les populations aneuploïdes prolifèrent toujours plus que les cellules tétraploïdes, quel que soit l'inhibiteur utilisé.

La différence notable entre la prolifération des populations de cellules aneuploïdes et tétraploïdes s'explique peut-être par le fait que, dans le cas de fortes concentrations d'inhibiteur, nous pouvons obtenir une très grande majorité de cellules tétraploïdes tandis qu'avec de plus faibles concentrations, toutes les cellules de la population ne sont pas touchées. Ainsi, dans le cas de faibles concentrations d'inhibiteur, il existe toujours dans la population des cellules 'normales' qui continuent de proliférer.

Ainsi, ces deux expériences nous ont permis d'évaluer que les inhibiteurs de la polymérisation des microtubules interfèrent avec le cycle cellulaire, à la fois en modifiant la mitose et en instaurant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 qui empêche ces cellules de proliférer.

6.3 Caractérisation du phénotype observé

6.3.1 L'arrêt des cellules est dû aux anomalies de la mitose.

Nous avons tout d'abord voulu savoir si le phénotype observé était le résultat d'un évènement lié au déroulement de la mitose ou s'il se produisait en phase G1 du fait de l'utilisation d'inhibiteurs. Puis nous avons voulu comparer cet arrêt avec d'autres arrêts du cycle cellulaire correspondant à des mécanismes de contrôle connus.

A priori, le phénotype obtenu avec les cellules aneuploïdes semble être la conséquence des défauts non corrigés en mitose. Néanmoins, nous avons voulu contrôler que l'arrêt observé

dans le cas de faibles concentrations de drogues n'est pas dû à un mécanisme de contrôle spécifique de la phase G1 et qu'il advient uniquement après une mitose anormale. Nous avons aussi montré que les cellules restent arrêtées en phase G1 lorsque l'on élimine les inhibiteurs après la mitose.

D'une part, nous avons mesuré la prolifération des cellules aneuploïdes via la mesure de l'incorporation de BrdU comme précédemment, cette fois-ci en présence continue ou non d'inhibiteur. D'autre part, les cellules REF52 ont été synchronisées en phase G1/G0 via un protocole de privation de sérum. Puis la reprise du cycle cellulaire a été stimulée par l'addition de milieu contenant du sérum et contenant ou non des inhibiteurs des microtubules. L'incorporation de BrdU après quelques heures a été mesurée. Les résultats sont présentés figure 12.

Les résultats de la figure 12A confirment que l'arrêt des cellules n'est pas dû au nocodazole mais plutôt aux anomalies qu'il induit. En effet, les cellules restent arrêtées en phase pseudo-G1 même après que l'on a éliminé les inhibiteurs du milieu (figure 12A, 24 heures puis milieu). Les résultats de la figure 12B permettent de conclure que les cellules déjà en phase G1 entrent en phase S de façon comparable, qu'elles soient cultivées en présence de nocodazole ou non. Cela signifie que l'arrêt des cellules observées précédemment n'est pas dû à un mécanisme spécifique de la phase G1 qui serait dépendant de la présence de nocodazole. Cela implique que l'arrêt des cellules en G1 intervient après la mitose anormale.

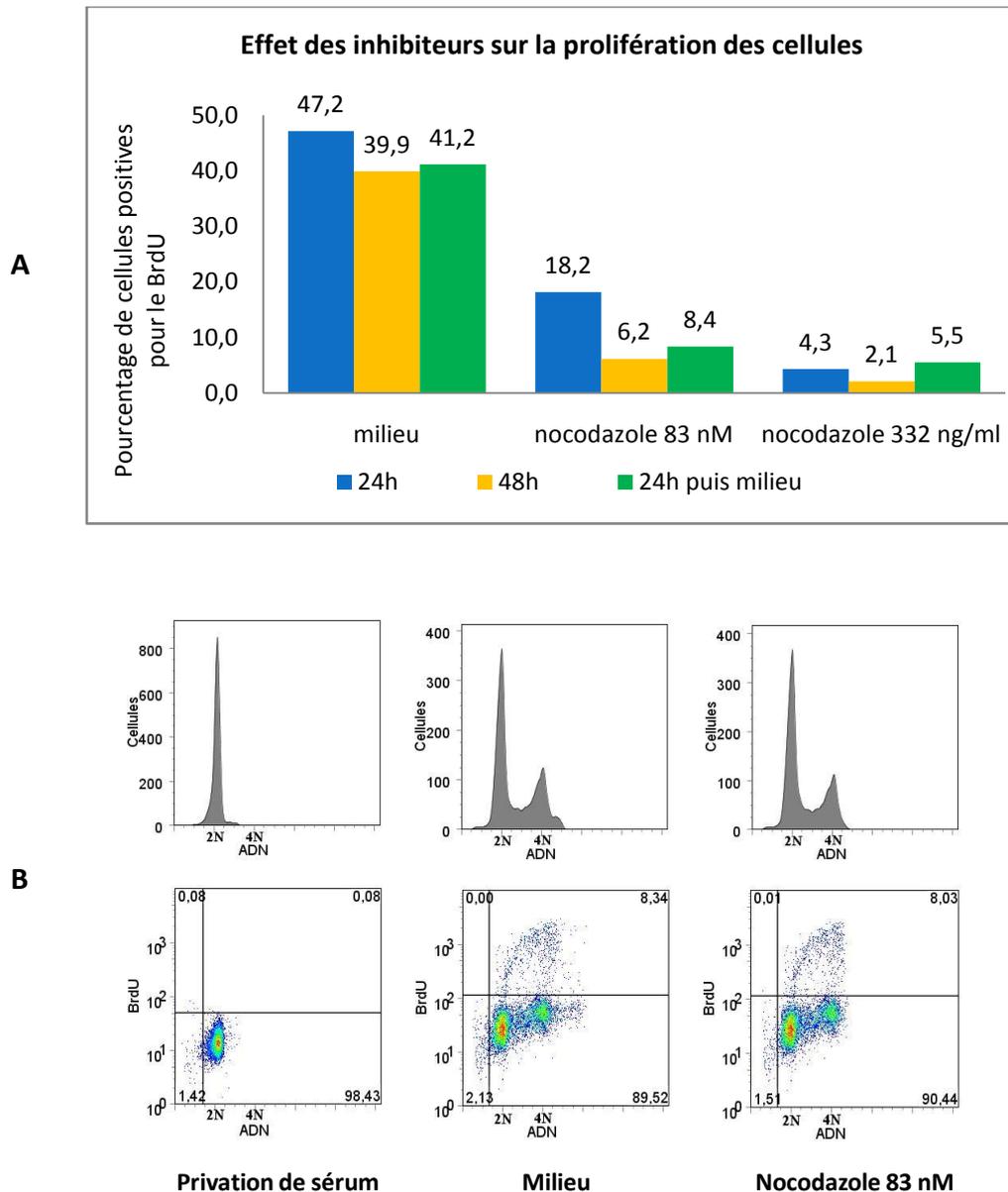


Figure 12 : L'arrêt des cellules en G1 intervient après la mitose anormale.

(A) L'expérience de la figure 11 a été reproduite avec du nocodazole, cette fois-ci en éliminant le nocodazole du milieu par rinçages successifs (24h plus milieu) après 24 heures d'incubation puis en laissant les cellules dans du milieu sans inhibiteur pendant 24 heures. L'intégration de BrdU a été mesurée et comparée à celle de cellules incubées dans du milieu contenant ou non du nocodazole pendant 24 et 48 heures. On observe que les cellules pour lesquelles le nocodazole a été éliminé du milieu restent arrêtées en G1. L'arrêt des cellules n'est donc pas dû uniquement au nocodazole, mais plutôt aux anomalies créées.

(B) Les cellules ont été synchronisées en phase G1 par privation de sérum puis stimulées par l'ajout de milieu contenant du sérum et du nocodazole (Nocodazole 83 nM) ou pas (Milieu). Après 4 heures les cellules ont été mises en présence de BrdU pendant 2 heures. Les cellules répliquent leur ADN de façon similaire en présence de nocodazole ou pas.

Les cellules qui deviennent tétraploïdes après *mitotic slippage* s'arrêtent en phase G1 selon un mécanisme qui fait intervenir la protéine suppresseur de tumeur p53. Ces cellules tétraploïdes surexpriment les protéines p53 et p21^{Cip1} (dont l'induction est sous la dépendance de p53). Nous avons voulu savoir si les cellules aneuploïdes arrêtées en phase G1 partageaient le même type de profil. Pour cela nous avons évalué par western blot la quantité de protéines p21^{Cip1} et p53 dans ces cellules. Les résultats sont présentés dans la Figure 13.

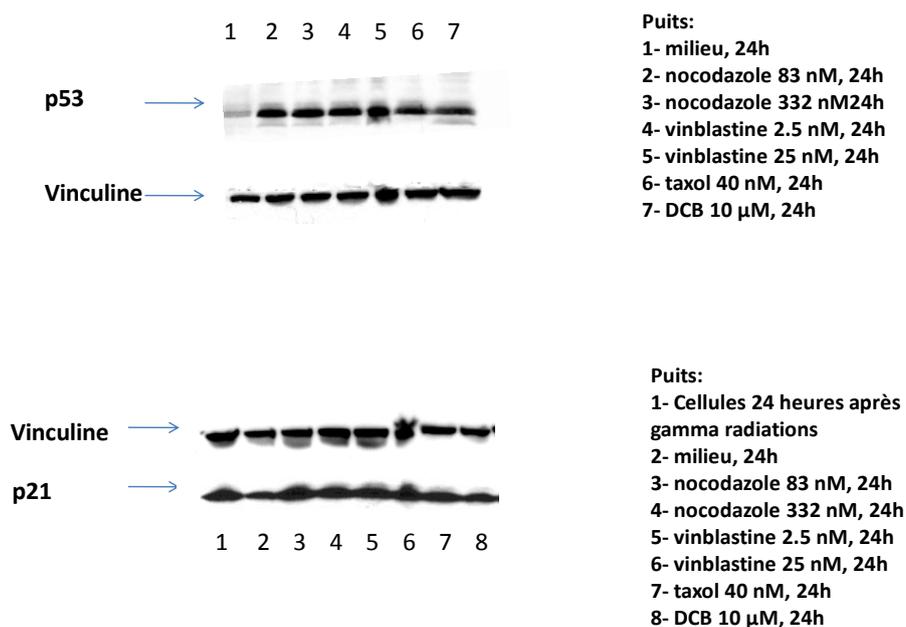


Figure 13 : Les cellules REF52 aneuploïdes et tétraploïdes surexpriment p21^{Cip1} et p53.

Western-blots d'extraits de cellules aneuploïdes et tétraploïdes. Les cellules REF52 asynchrones ont été cultivées dans du milieu normal ou en présence de vinblastine (2,5 nM ou 20 nM), de nocodazole (83 nM ou 332 nM) pendant 24 heures, de taxol (40 nM) ou bien de Dihydrocytochalasine B (DCB) (10 μM). Les concentrations les plus importantes de vinblastine et de nocodazole ainsi que la DCB à la concentration utilisée induisent des cellules tétraploïdes arrêtées en pseudo-G1. Les plus faibles concentrations de nocodazole, de vinblastine ainsi que le taxol induisent des cellules aneuploïdes mais pas de cellules tétraploïdes. La protéine Vinculine a été utilisée comme témoin de charge. Les western-blots révèlent que dans toutes les conditions où la mitose est perturbée par des inhibiteurs, p21^{Cip1} et p53 sont surexprimées dans les cellules résultantes arrêtées en pseudo-G1.

Les résultats montrent que les protéines p53 et p21^{Cip1} sont surabondantes dans les cellules aneuploïdes, quel que soit le traitement utilisé (nocodazole, vinblastine, taxol) (figure 13, puits 2, 4 et 6 pour la protéine p53, puits 3, 5 et 7 pour p21^{Cip1}). Les niveaux de protéines

sont supérieurs au contrôle et comparables aux niveaux de protéines obtenus dans diverses conditions qui induisent toutes une activation du *post-mitotic checkpoint*, à savoir l'utilisation de fortes concentrations d'inhibiteurs des microtubules ou de DCB (Dihydrocytochalasine B, un inhibiteur de la polymérisation d'actine qui empêche la cytokinèse dans les conditions de l'expérience) (figure 13, puits 3, 5 et 7 pour p53, puits 4, 6 et 8 pour p21^{Cip1}).

L'existence d'un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou pseudo-G1, lié à la surexpression de p21^{Cip1} et p53 rappelle l'arrêt observé lorsque les cellules entrent en sénescence, notamment la sénescence précoce induite par différents types de stress. Les cellules sénescents humaines ont la particularité d'avoir une activité enzymatique de la β -galactosidase à un pH légèrement acide (pH=6) qui permet de les distinguer des autres cellules. Afin de savoir si les cellules tétraploïdes et les cellules aneuploïdes arrêtées étaient des cellules entrées en sénescence nous avons mesuré le nombre de cellules présentant une activité β -galactosidase.

Pour vérifier notre hypothèse nous avons utilisé des cellules IMR 90, des fibroblastes humains normaux, donc non transformés. Ces cellules nous donnent des résultats analogues à ceux obtenus avec les REF52, à savoir, elles s'arrêtent en phase G1 après traitement avec de faibles doses d'inhibiteurs. Les résultats de ces expériences sont présentés figure 14.

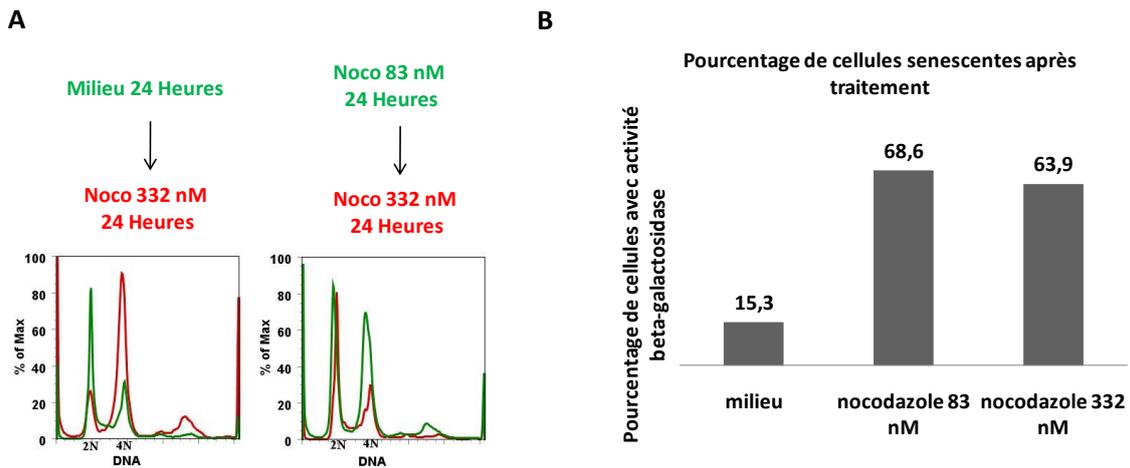


Figure 14 : Les cellules IMR90 aneuploïdes et tétraploïdes deviennent sénescents.

A : Les cellules IMR90 asynchrones ont été cultivées dans du milieu normal ou en présence de nocodazole (83 nM) pendant 24 heures (profils correspondants aux graphes verts). Les inhibiteurs ont ensuite été éliminés par rinçages successifs avec du PBS. Les cellules ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires dans du milieu contenant 332 nM de nocodazole (profils correspondants aux graphes rouges). Tandis que les cellules contrôles progressent et dupliquent leur ADN, le profil des cellules aneuploïdes indique qu'elles sont arrêtées en phase G1 ou pseudo-G1.

B : Les cellules IMR90 ont été cultivées dans du milieu ou en présence de nocodazole (83 nM ou 332 nM) pendant 6 jours. Les cellules ont ensuite été fixées et marquées de façon à révéler une éventuelle activité de l'enzyme β -Galactosidase à pH=6 selon un crible blanc/bleu. Les cellules présentant une activité de l'enzyme au pH considéré apparaissant en bleu au microscope ont été comptées et le pourcentage de cellules sénescents a pu être évalué. Pour toutes les conditions n=150.

Les résultats de la figure 13 permettent de dire que la grande majorité des cellules soit aneuploïdes soit tétraploïdes, présente des signes associés à la sénescence après plusieurs jours de traitements. On constate que la population contrôle contient 15,3% de cellules sénescents. Ceci s'explique par le fait que les cellules IMR90 sont des cellules non transformées et pré-sénescents. Ainsi, cette expérience permet d'établir que les cellules tétraploïdes ou aneuploïdes s'arrêtent et entrent en sénescence. Cet arrêt s'accompagne d'une surabondance des protéines p21^{Cip1} et p53, comme dans certains cas de sénescence précoce (figure 13).

La sénescence précoce est le phénotype de cellules qui ont subi des stress, tel des dommages à l'ADN. Compte tenu des défauts observés par microscopie précédemment, il ne semble pas que l'on observe de ponts chromosomiques dans le cadre de nos expériences (figure 3 à 6). Nous avons néanmoins voulu vérifier que les cellules cultivées dans de faibles doses de

nocodazole n'étaient pas sujettes à des dommages à l'ADN. Pour cela, nous avons mesuré le niveau de phosphorylation de la protéine H2AX, un variant d'histone dont la forme phosphorylée γ -H2AX s'accumule au niveau des coupures des brins d'ADN et intervient ainsi dans la signalisation permettant la mise en place des systèmes de réparation en cas de dommages. La doxorubicine et VP-16 ont été utilisés dans les contrôles positifs du fait de leur capacité à induire des dommages à l'ADN. La doxorubicine et VP-16 sont des inhibiteurs de la Topoisomerase II. Les résultats sont présentés figure 15.

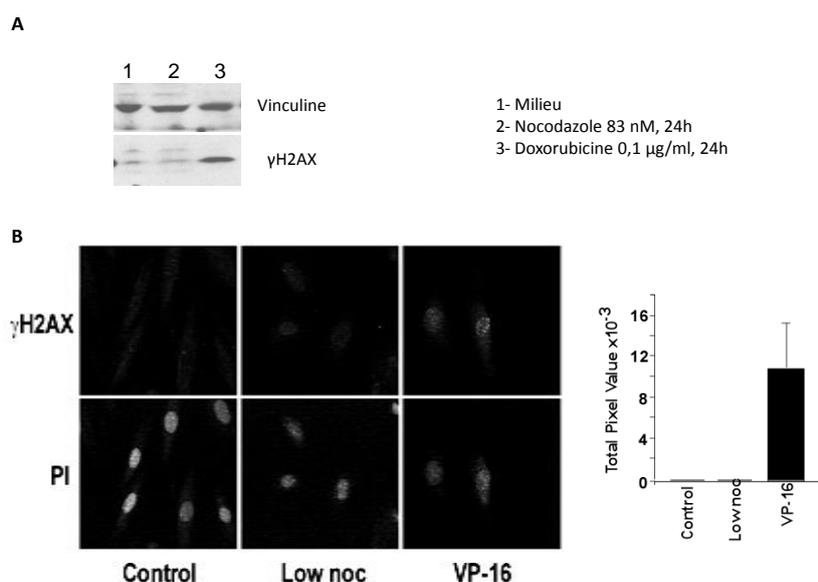


Figure 15 : Les cellules REF52 n'ont pas de dommages à l'ADN.

(A) Western blot d'extraits de cellules REF52 cultivées dans du milieu (1), 83 nM de nocodazole (2), ou bien 0,1 µg/ml de doxorubicine (3) qui induit des coupures double brin de l'ADN. L'anticorps utilisé reconnaît le variant d'histone γ H2AX.

(B) Les cellules REF52 ont été incubées dans 83 nM de nocodazole (*low noc*) pendant 24 heures ou en présence de VP-16 (contrôle positif pour les dommages à l'ADN), puis fixées et marquées par l'anticorps reconnaissant γ H2AX. Dans les cellules traitées avec VP-16, γ H2AX se localise dans le noyau sous forme d'agrégats. Cette localisation n'est pas observée ni dans le cas de cellules cultivées dans du milieu (control), ni dans les cellules aneuploïdes. La quantification par comptage des photons confirme ce résultat.

Ces expériences n'ont pas montré la présence de dommages à l'ADN dans les cellules aneuploïdes. L'absence de signal significatif à la fois par western blot et par quantification des photons nous permet d'affirmer que les cellules aneuploïdes n'ont pas de dommages à l'ADN décelables ou suffisants pour induire une réponse cellulaire impliquant γ H2AX.

6.3.2 Le contournement de cet arrêt nécessite l'inhibition de p53 et de pRb

Le rôle de la protéine kinase p38MAPK dans l'induction de sénescence après différents types de stress dont les dommages à l'ADN et le stress osmotique est déjà bien connu (Han and Sun 2007). p38MAPK est activée par phosphorylation sur les sites Thréonine 180 et Tyrosine 182. p38MAPK est aussi activée en mitose en présence de concentrations de nocodazole conduisant à la dépolymérisation des microtubules et l'activation du point de contrôle mitotique (Takenaka, Moriguchi et al. 1998; Mikhailov, Shinohara et al. 2005).

Nous avons donc voulu savoir si la protéine p38MAPK joue un rôle dans l'arrêt des cellules aneuploïdes. Tout d'abord, nous avons cherché à savoir si la kinase p38MAPK était effectivement active dans les cellules aneuploïdes et tétraploïdes après traitement avec du nocodazole. Pour cela nous avons évalué la présence de p38MAPK phosphorylée par western blot dans des extraits cellulaires correspondant aux conditions mises au point précédemment, les résultats sont présentés figure 16.

Les résultats de cette expérience permettent d'envisager une implication de p38MAPK dans l'arrêt des cellules aneuploïdes. En effet, dans les extraits que nous observons en western blot, la protéine p38 MAPK est phosphorylée sur au moins un des deux sites induisant son activation, ce qui laisse penser que la kinase est alors active. Les échantillons du western blot correspondent aux conditions vues au début de ce chapitre dans lesquelles les cellules étaient tétraploïdes ou aneuploïdes et en phase G1. Dans l'extrait correspondant aux cellules non traitées, la quantité de p38MAPK phosphorylée est à peine décelable. Nous en avons donc déduit que dans la population de cellules aneuploïdes arrêtées en phase G1, p38MAPK est active.

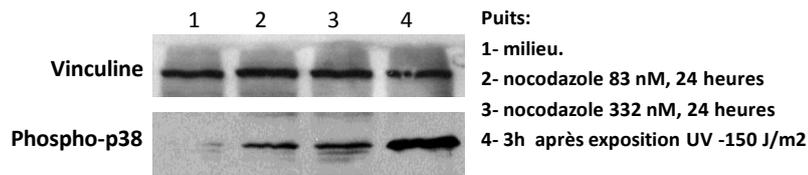


Figure 16 : p38MAPK est activée dans les extraits de cellules aneuploïdes et tétraploïdes.

Western-blot d'extraits de REF52 traitées de façon à obtenir des cellules aneuploïdes et tétraploïdes. La Vinculine a été utilisée comme témoin de charge. L'anticorps utilisé pour reconnaître la protéine p38MAPK phosphorylée au niveau des résidus thréonine 180 et/ou tyrosine 182. Dans les extraits de cellules aneuploïdes ou tétraploïdes la protéine p38MAPK est phosphorylée et donc activée. Cette activation est moins importante que celle obtenue via exposition à des UV de type C (puit 4), mais plus importante que dans la population contrôle (puit 1).

Dans la mesure où nous n'avons pas décelé de dommages à l'ADN plus important dans les cellules aneuploïdes que dans la population de cellules non traitées, nous avons fait l'hypothèse que p38MAPK était activée par le nocodazole pendant la mitose anormale. Afin de vérifier cette hypothèse nous avons suivi par western blot le niveau de phosphorylation de p38MAPK dans des extraits de cellules REF52 synchronisées en phase S puis relâchées et cultivées avec ou sans nocodazole. Les résultats de cette expérience sont présentés figure 17.

En observant les deux western-blots on s'aperçoit que dès le début de l'expérience, au point correspondant à 3 heures (puit 3), les cellules avec ou sans nocodazole contiennent déjà une certaine quantité de p38MAPK phosphorylée. On constate que le niveau de phosphorylation de p38MAPK diminue (figure 17, puits 5 et 6 pour les cellules contrôles, 4 et 5 pour le nocodazole), puis remonte à nouveau par la suite, ce qui serait compatible avec le rôle récemment publié de p38MAPK dans la transition phase G2/mitose et dans le déroulement de la mitose même en absence de stress (Cha, Wang et al. 2007). L'analyse du niveau de Cycline B dans les différents extraits met en évidence un certain délai de sortie de mitose pour les cellules cultivées en présence de nocodazole (figure 17, puits 10 et 12). Cette information, avec les expériences précédentes (présentées figure 8), nous permet de confirmer que dans le cadre de nos expériences le point de contrôle mitotique est activé.

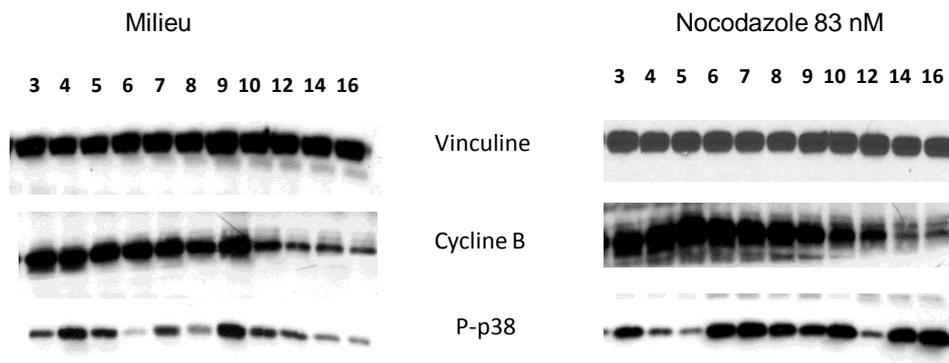


Figure 17 : p38MAPK est activée en sortie de mitose anormale.

Western-blot d'extraits de REF52 traitées de façon à obtenir des cellules aneuploïdes. Les cellules REF52 ont été synchronisées en phase S par l'utilisation d'aphidicholine puis relâchées dans du milieu contenant ou non du nocodazole. Les numéros des puits correspondent aux heures passées depuis l'élimination de l'aphidicholine du milieu par rinçages successifs avec du PBS. La Vinculine a été utilisée comme témoin de charge. La Cycline B permet d'indiquer la transition anaphase/télophase et le début de la sortie de mitose. L'anticorps utilisé pour l'immunodétection de phospho-p38MAPK est le même que précédemment. On note que p38MAPK est fortement activée après la sortie de mitose dans le cas des cellules en présence de nocodazole.

On constate par ailleurs que, si la protéine p38 MAPK est activée pendant la mitose dans les deux conditions de l'expérience, dans le cas des cellules cultivées dans du milieu sans nocodazole, la protéine est déphosphorylée lors de la sortie de la mitose. La baisse du niveau de p38MAPK phosphorylée, qui peut être le fait soit d'une phosphatase soit de l'inhibition d'une kinase, correspond dans le temps à la baisse de Cycline B. Dans le cas des cellules cultivées en présence de nocodazole on note que le niveau de phospho-p38MAPK semble baisser en sortie de mitose dans un premier temps, mais qu'il remonte rapidement et reste élevé alors que le niveau de la Cycline B diminue (figure 17, nocodazole, puits 12 et 14).

Ainsi, l'activation de p38MAPK visible dans nos extraits précédents (figure 16) semble être le résultat d'une activation qui interviendrait pendant la transition vers la phase G1 ou en début de phase G1.

La sénescence précoce après dommages à l'ADN est dépendante de p38MAPK et de la voie de la protéine p53. Lorsque p38MAPK est inhibée par l'ajout d'un inhibiteur chimique, le

SB203580, les cellules exposées à des dommages à l'ADN se révèlent incapables de s'arrêter et d'entrer en sénescence.

Pour savoir si l'arrêt que nous observons avec les cellules aneuploïdes dépend de la protéine p38MAPK et de la voie de p53, nous avons commencé par inhiber p38MAPK avec SB203580, en suivant les conditions établies précédemment (Takenaka, Moriguchi et al. 1998). Pour cette expérience nous avons utilisé les concentrations d'inhibiteur utilisées par d'autres équipes qui travaillaient aussi avec des cellules de rat et notamment des REF52 (Kukushkin, Abramova et al. 2002). Les résultats sont présentés figure 18. Les résultats de cette expérience nous ont permis de conclure que la protéine p38MAPK n'est pas responsable de l'arrêt observé. En effet nous n'observons pas de différence entre les cellules traitées avec l'inhibiteur et les autres. L'activation de p38MAPK pourrait être une conséquence de la signalisation aboutissant à l'arrêt des cellules.

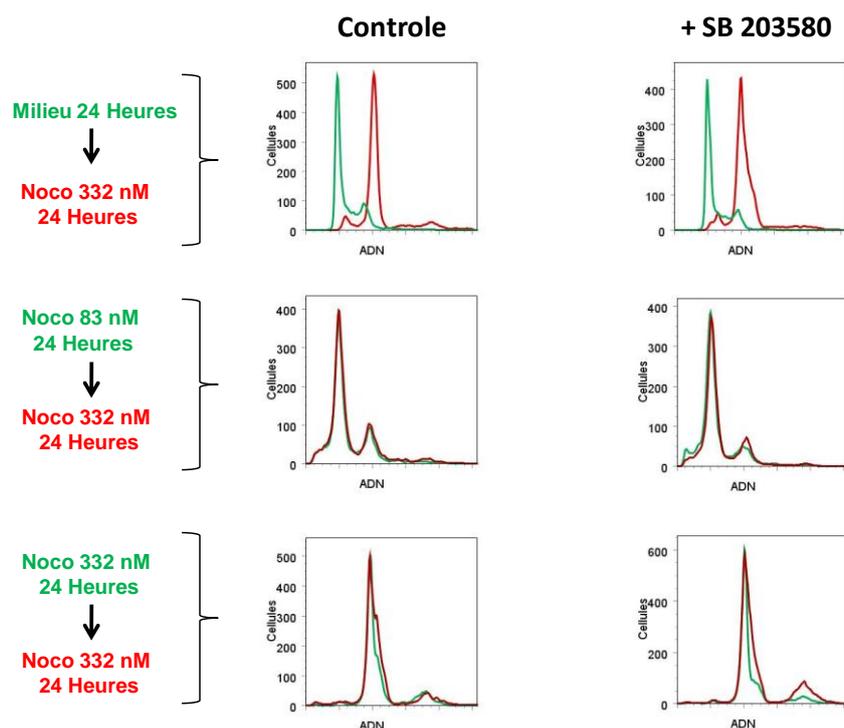


Figure 18 : L'inhibition de p38MAPK est insuffisante pour contourner l'arrêt en G1.

Les cellules REF52 ont été synchronisées en phase S avec de l'aphidicoline, puis relâchées dans du milieu. Après une heure, le milieu des cellules a été changé pour du milieu contenant l'inhibiteur de p38MAPK (série SB 203580, 25 μ M) ou non (contrôle). Après deux heures de pré-incubation avec l'inhibiteur, le milieu des cellules a été changé pour du milieu contenant les concentrations de nocodazole indiquées sur le schéma et du SB 203580 (25 μ M)) ou pas (contrôle) (profils en vert). Après 24 heures, les cellules ont été rincées et incubées dans du milieu contenant 332 nM de nocodazole mais pas de SB 203580 (pour les deux séries, profils en rouge). On n'observe pas de différence entre les différentes conditions d'inhibition de p38MAPK.

Nous avons voulu savoir si la voie de p53 est impliquée dans l'arrêt que nous observons. Nous avons utilisé des cellules REF52-p53DD, c'est-à-dire des cellules REF52 surexprimant la protéine p53DD, un mutant dominant négatif de p53. p53DD est une forme tronquée de p53 qui possède la séquence d'oligomérisation de p53 mais pas celle correspondant à la fonction de facteur de translation (Gottlieb, Haffner et al. 1994). p53DD recrute et séquestre la protéine p53 endogène par oligomérisation et empêche sa fonction d'activateur de la transcription et donc la surexpression de p21^{Cip1}. Les cellules REF52-p53DD ont permis de montrer que l'arrêt en G1 des cellules tétraploïdes dépend en partie de la protéine p53 (Andreassen, Lohez et al. 2001). Nous avons donc répété les expériences menées précédemment avec ces cellules. Les résultats de ces expériences sont présentés figure 19.

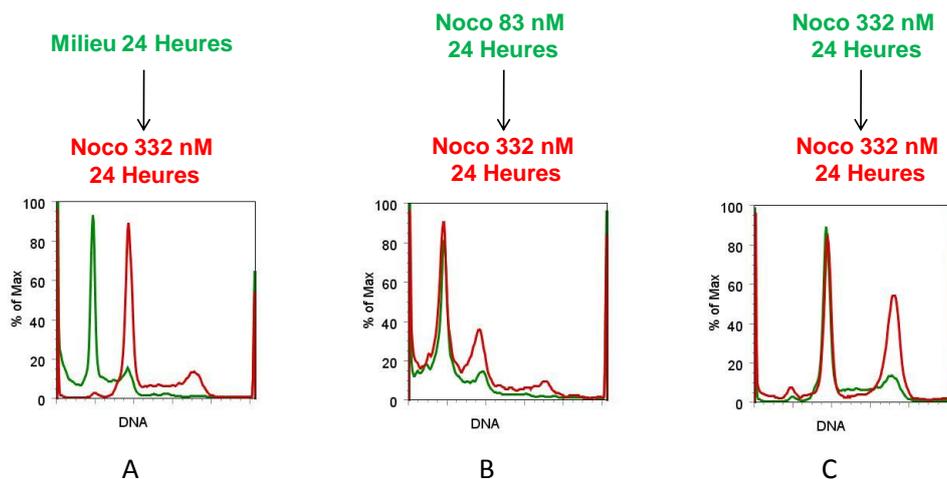


Figure 19 : Les cellules REF52-p53DD aneuploïdes restent arrêtées en phase G1 tandis que les REF52-p53DD tétraploïdes progressent en phase S.

Les cellules REF5-p53DD asynchrones ont été cultivées dans du milieu normal ou en présence de 83 nM ou 332 nM de nocodazole pendant 24 heures (profils correspondants aux graphes verts). Les inhibiteurs ont ensuite été éliminés par rinçages successifs avec du PBS. Les cellules ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires dans du milieu contenant 332 nM de nocodazole (profils correspondants aux graphes rouges). Tandis que les cellules contrôles progressent et dupliquent leur ADN, le profil des cellules aneuploïdes ne change pas, ce qui signifie que ces cellules ne prolifèrent plus et sont arrêtées en phase G1 ou pseudo-G1. Les cellules tétraploïdes progressent et deviennent polyploïdes

D'après nos résultats, bien que la protéine p38MAPK soit phosphorylée et donc activée dans les cellules aneuploïdes, et bien que les protéines p21^{Cip1} et p53 soient surexprimées et stabilisées, ni l'inhibition de p38MAPK ni l'inhibition de la fonction de facteur de transcription de p53 ne permettent de contourner l'arrêt en G1. Effectivement, le comportement des cellules REF52-p53DD aneuploïdes (figure 19B) est comparable à celui des cellules REF52 présentées dans les figures précédentes (figure 10B). On peut noter que comme pour les REF52, les REF52-p53DD aneuploïdes restent majoritairement arrêtées en phase G1.

Nous avons envisagé qu'une autre voie que celle de p53 puisse être impliquée dans l'arrêt des cellules aneuploïdes en G1. La protéine pRb est une protéine qui a un rôle central dans la régulation de la phase G1 et qui est, comme p53, mutée dans un grand nombre de cancers. Nous avons fait l'hypothèse que si à la fois p53 et pRb étaient inhibées, les cellules aneuploïdes pourraient être en mesure de proliférer malgré leurs défauts.

Nous avons donc observé le comportement de cellules TAG, des cellules REF52 transformées par l'antigène grand T du virus SV40, dans les mêmes conditions que précédemment, à savoir en présence de fortes et faibles concentrations de nocodazole. L'antigène grand T de SV40 a la propriété de se lier à p53 et aux protéines de la famille des poquets protéines à laquelle appartient pRb (Ahuja, Saenz-Robles et al. 2005). Cette liaison empêche le recrutement de p53 au niveau des promoteurs que cette protéine active habituellement, et en même temps inhibe la liaison de pRb aux facteurs de transcriptions E2F. Cela a donc deux effets pour la cellule : d'une part p21^{Kip1} n'est pas surexprimée et ne peut contribuer à arrêter le cycle cellulaire en G1 et, d'autre part, pRb n'est pas en mesure d'inhiber la transcription des gènes nécessaires au passage en phase S. Les résultats de cette expérience sont présentés dans la figure 20.

Ces résultats nous permettent de voir que, en l'absence de p53 et pRb fonctionnelles, les cellules aneuploïdes ne restent pas arrêtées en phase G1 mais au contraire continuent de cycliser (figure 20B). Lorsque ces cellules aneuploïdes sont cultivées en présence de 332 nM de nocodazole, elles s'accumulent pour former un pic correspondant à 4N chromosomes et même 8N chromosomes. Ce dernier pic correspond à des cellules aneuploïdes qui ont répliqué leur ADN deux fois, ceci étant dû à l'absence de contrôle en G1 susceptible d'arrêter des cellules aneuploïdes ou même tétraploïdes. Il est possible que la présence de cellules avec 8N chromosomes après seulement 24 heures dans du milieu contenant 332 nM de nocodazole soit due au fait que les TAG ont un cycle cellulaire plus rapide que les cellules non transformées.

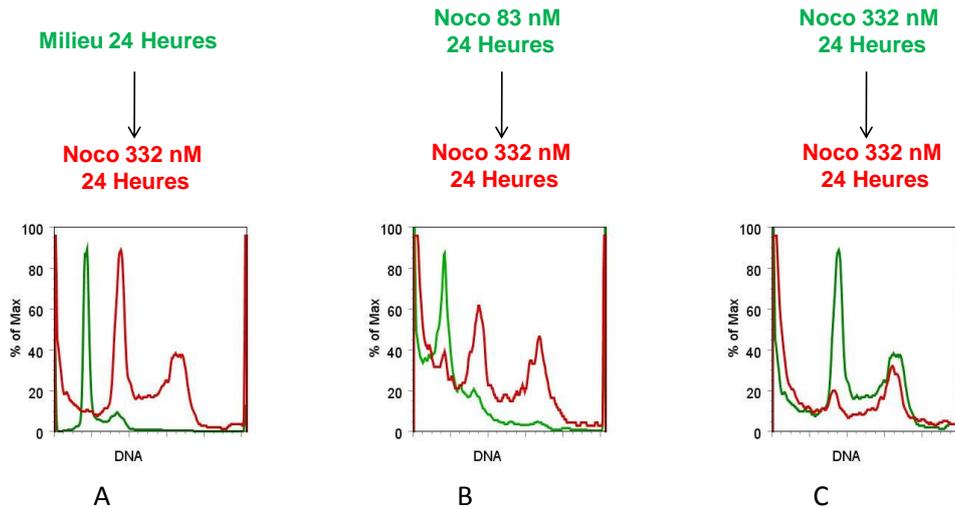


Figure 20 : L'antigène grand T de SV40 permet de contourner l'arrêt des cellules aneuploïdes.

Les cellules TAG (REF52 transformées via l'antigène grand T de SV40) asynchrones ont été cultivées dans du milieu normal ou en présence de 83 nM ou 332 nM de nocodazole pendant 24 heures (profils correspondants aux graphes verts). Les inhibiteurs ont ensuite été éliminés par rinçages successifs avec du PBS. Les cellules ont été incubées pendant 24 heures supplémentaires dans du milieu contenant 332 nM de nocodazole (profils correspondants aux graphes rouges). Les cellules transformées ont perdu les mécanismes de contrôle de la prolifération induits par l'aneuploïdie et la tétraploïdie.

L'entrée en sénescence dépendant de pRb s'accompagne de l'élévation de la quantité de protéine p27^{Kip1}, un inhibiteur des complexes Cycline-Cdk (Alexander and Hinds 2001). p27^{Kip1} pourrait être nécessaire à l'établissement ou au maintien de la sénescence. Par ailleurs, la protéine pRb est directement impliquée dans la régulation de la dégradation de p27^{Kip1} (Santamaria and Pagano 2007). Dans la mesure où l'arrêt des cellules aneuploïdes peut-être empêché dans les cellules REF52-TAG par l'inhibition de p53 et pRB conjointement, nous avons voulu savoir si à la fois p21^{Cip1} et p27^{Kip1} étaient surexprimés dans ces cellules. Les résultats de cette expérience sont présentés figure 21.

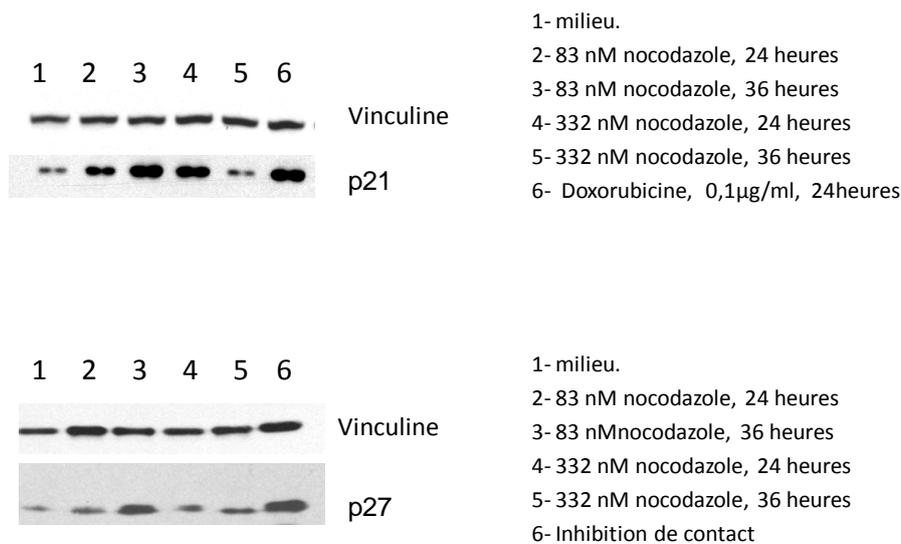


Figure 21 : Les cellules REF52 aneuploïdes surexpriment p21^{Cip1} et p27^{Kip1}.

Western-blots d'extraits de cellules aneuploïdes et tétraploïdes. Les cellules REF52 asynchrones ont été cultivées dans du milieu normal ou en présence de nocodazole (83 nM et 332 nM) pendant 24 et 36 heures. La doxorubicine a été utilisé pour induire des dommages à l'ADN (contrôle positif pour p21^{Cip1}). L'inhibition de contact a été utilisée comme contrôle positif pour p27^{Kip1}. Le marquage de la protéine Vinculine a été utilisée comme témoin de charge.

La protéine p21^{Cip1} est surexprimée à la fois dans l'arrêt des cellules aneuploïdes et dans l'arrêt des cellules tétraploïdes, ce qui confirme les résultats précédents (figure 21, puits 2, 3 et 4 pour p21^{Cip1}). On note que la quantité de p21^{Cip1} augmente dans les cellules aneuploïdes entre 24 heures et 36 heures, ce qui pourrait être dû à la mise en place progressive de la sénescence des cellules de cette population. Ce résultat est à rapprocher de l'expérience d'incorporation de BrdU qui nous a permis de voir que le nombre de cellules arrêtées augmente encore après 24 heures de traitement (figure 11). L'analyse du niveau de protéine p27^{Kip1} montre que les cellules REF52 contiennent déjà un niveau de protéine décelable en western blot en l'absence de stimulus particulier. p27^{Kip1} augmente seulement après 36 heures de traitement et seulement dans les cellules aneuploïdes. Il est possible que l'élévation tardive de cette protéine corresponde à la mise en place de la sénescence et soit la conséquence de la régulation de sa dégradation par pRb.

Nous avons voulu comparer les niveaux des protéines p21^{Cip1} et p27^{Kip1} dans ces mêmes conditions entre les cellules REF52 et les cellules TAG, qui ne s'arrêtent pas en phase G1. Les résultats de cette expérience sont présentés figure 22.

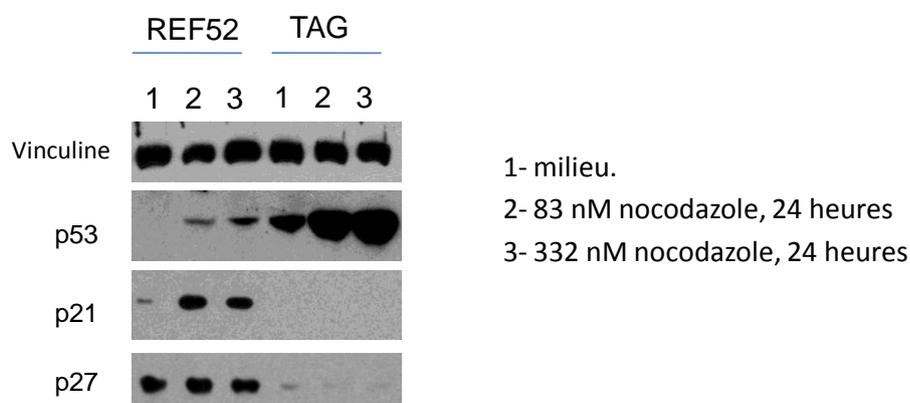


Figure 22 : Comparaison entre les cellules aneuploïdes et tétraploïdes REF52 et TAG.

Western-blots d'extraits de cellules REF52 et TAG aneuploïdes et tétraploïdes après traitement avec du nocodazole. Les cellules asynchrones ont été cultivées dans du milieu normal ou en présence de nocodazole (83 nM ou 332 nM) pendant 24 heures.

Les résultats de la figure 22 nous montrent que p21^{Cip1} et p27^{Kip1} sont que très peu exprimées dans les cellules TAG, même en présence de nocodazole. Ainsi, le contournement de l'arrêt des cellules aneuploïdes par les cellules TAG se produit en l'absence de p21^{Cip1} et de p27^{Kip1}. Ces deux protéines sont des inhibiteurs de l'activité des Cyclines–Cdk en phase G1, donc des effecteurs directs des mécanismes de contrôle permettant aux cellules de rester arrêtées après la mitose. Dans le cas des cellules TAG, on peut voir que le nocodazole à faible ou forte concentration, induit une stabilisation de p53 (figure 22, TAG, puits 2 et 3). Cette stabilisation ne se traduit pas par une augmentation de p21^{Cip1}, à cause de la présence de l'antigène grand T. Par ailleurs, pRb régule l'accumulation de p27^{Kip1} en phase G1 en se liant directement à Cdh1 (Santamaria and Pagano 2007). Dans le cas de cellules transformées par l'antigène grand T, cette liaison est empêchée, ce qui pourrait expliquer que la régulation de p27^{Kip1} est modifiée.

Conclusion et perspectives

7 Conclusions et perspectives

7.1 Conclusion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'existence d'un mécanisme d'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 dans les cellules primaires de mammifères traitées avec de faibles concentrations d'inhibiteurs des microtubules, la vinblastine et le nocodazole.

Cet arrêt se produit uniquement après que les cellules ont traversé la mitose en présence de ces inhibiteurs. L'utilisation de faibles concentrations, soit de nocodazole, soit de vinblastine, dans le milieu de culture induit des défauts de mise en place du fuseau mitotique et de positionnement des chromosomes. Ces défauts, bien qu'ils activent le point de contrôle mitotique et provoquent un délai de la sortie de mitose des cellules, ne permettent pas un arrêt complet des cellules en métaphase. Malgré les anomalies, les cellules sont capables d'entrer en anaphase, et elles procèdent ensuite jusqu'à la cytokinèse. La population résultant de tels traitements est constituée pour la plupart de cellules aneuploïdes.

L'arrêt des cellules aneuploïdes se caractérise par une surabondance des protéines p53, p21^{Cip1} et p27^{Kip1} ainsi qu'une activation de la protéine p38MAPK. Par ailleurs, les cellules traitées avec de faibles ou de fortes concentrations d'inhibiteurs des microtubules présentent une activité de l'enzyme β -galactosidase après plusieurs jours de traitement, un phénotype qui accompagne la sénescence rélicative ou la sénescence précoce.

L'inhibition de p53 par un dominant négatif (p53DD) ne modifie pas l'arrêt des cellules aneuploïdes. L'arrêt en G1 du *post-mitotic checkpoint*, tout comme le point de contrôle dû aux dommages à l'ADN et la sénescence précoce qu'il induit, dépendent de p53 et sont contournés lorsque p53 est inhibée ou mutée. Par ailleurs, nous avons trouvé que l'arrêt des cellules aneuploïdes est indépendant de la réponse aux dommages à l'ADN. L'arrêt des cellules aneuploïdes est donc différent à la fois du *post-mitotic checkpoint* et de l'arrêt en G1 après dommages à l'ADN et semble impliquer une ou plusieurs voies de signalisation autres que la voie de p53.

Lorsque les cellules sont transformées par l'antigène grand T de SV40, elles perdent leur capacité à s'arrêter après une mitose défectueuse. L'antigène grand T de SV40 transforme les cellules en liant p53 et les protéines de la famille des pockets protéines (pRb, p103, p107), ce qui a pour effet d'inhiber leur activité d'inhibiteurs de la transcription. Il est donc possible que pRb, p130 ou p107 soient responsables de l'arrêt des cellules aneuploïdes. Il est possible aussi que l'activité synergique de p53 et de pRb soit nécessaire à cet arrêt.

Au début de ce projet, nous avons posé la question de savoir si la prolifération des cellules aneuploïdes est régulée. Pendant la durée de ma thèse, d'autres laboratoires se sont attachés à répondre eux aussi à cette question, en employant des méthodes similaires aux nôtres ou bien au contraire en suivant des modèles différents. On peut discerner deux approches du problème de l'aneuploïdie et de l'instabilité chromosomique.

La première approche est une approche pharmacologique qui consiste à utiliser des inhibiteurs des microtubules pour créer des défauts en mitose. C'est l'approche que nous avons choisie. Elle a pour fondement la découverte par Cimini et al. que les techniques de synchronisation des cellules en culture cellulaire utilisant le nocodazole induisent une augmentation des anomalies de ségrégation des chromosomes et conduisent à des cellules aneuploïdes (Cimini, Howell et al. 2001). En incubant les cellules pendant 3 heures dans du nocodazole puis en éliminant l'inhibiteur, Cimini et Al ont observé que le nombre de chromosomes non alignés augmentait de 1,1% à 17%, de plus la plupart des défauts créés correspondent à des chromosomes mérotéliques. Cette technique a été utilisée récemment par Duane Compton dans une publication consacrée à la relation entre aneuploïdie et instabilité chromosomique (Thompson and Compton 2008). L'équipe de Duane Compton a observé le comportement de plusieurs lignées cellulaires issues de cancers soumises à plusieurs stress mitotiques successifs (fortes doses de nocodazole suivis de l'élimination de l'inhibiteur) et comparé les lignées dont le caryotype est stable et celles dont le caryotype est instable (les cellules de type CIN). Leur conclusion est que dans les lignées CIN, lorsque l'aneuploïdie est provoquée par l'augmentation de chromosomes mérotéliques, un mécanisme existe qui induit une augmentation de la variation du caryotype, le phénotype même de l'instabilité chromosomique, à partir de ces erreurs. Lorsque la même méthode est utilisée sur des lignées

dont le caryotype est stable, les erreurs causées par les chromosomes mérotéliques créent des cellules aneuploïdes, mais cette aneuploïdie ne se transforme pas en instabilité chromosomique. Les cellules de ces lignées stables (non CIN) devenues aneuploïdes ont une prolifération ralentie et après quelques passages, la population retrouve le niveau de variation du caryotype des cellules d'origine, ce qui signifie que les cellules aneuploïdes non seulement ne créent pas d'instabilité chromosomique, mais aussi qu'elles ne prolifèrent pas et tendent à disparaître.

Une autre approche de la question du rôle de l'aneuploïdie consiste à amplifier les erreurs de ségrégation en diminuant l'efficacité du point de contrôle mitotique. Cela peut être réalisé par des délétions des protéines du point de contrôle mitotique. Cette approche a été choisie notamment par Don Cleveland, qui a utilisé des souris mutées pour CENP-E, une protéine impliquée dans le point de contrôle mitotique (Weaver, Silk et al. 2007). Les souris CENP-E+/- ne développent pas de tumeurs, sauf si la délétion est associée à une transformation par l'antigène grand T de SV40. Par contre, dans le cas de souris CENP-E+/-, p19ARF-/-, les résultats sont mixtes : les souris sont capables de développer des tumeurs dans les seuls cas où les cellules greffées étaient issues de cultures en agar mou ayant réussi à former des colonies. Il est envisageable que ces tumeurs aient pu progresser grâce à des mutations supplémentaires facilitées par l'absence de p19ARF, une protéine qui permet la régulation de p53. Ainsi, l'aneuploïdie seule n'a pas de propriété transformante, mais, en association avec des modifications des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire, elle permet de promouvoir l'instabilité chromosomique. D'autres études impliquant des protéines du point de contrôle mitotique ont été publiées. Le travail de l'équipe de Jan van Deursen sur les protéines BubR1, Bub3 et Rae, est très instructif. Dans le cas de souris BubR1 +/-, le phénotype observé est celui d'animaux présentant des signes de vieillissement et de sénescence cellulaire précoce dans certains tissus (Baker, Jeganathan et al. 2004). Fait intéressant, ce phénotype est exacerbé par l'inactivation de p19Arf et diminué par l'inactivation de p16Ink4 (Baker, Perez-Terzic et al. 2008). Ces données laissent penser que la voie pRb/p16Ink4 pourrait être responsable de la sénescence que nous observons. Il est intéressant de noter que les souris Bub3+/-, Rae+/- présentent elles aussi des signes de vieillissement précoce et de sénescence au niveau cellulaire, tandis que les animaux ayant une seule modification (soit Bub3+/-, soit Rae+/-) (Baker, Jeganathan et al. 2006).

Nous proposons, à la lumière de nos résultats, que les cellules ont un mécanisme qui permet d'empêcher la prolifération des cellules aneuploïdes en induisant la sénescence de celles-ci. Ce mécanisme permet d'éliminer les cellules anormales et donc de conserver une population homogène. Il est probable que les cellules de type CIN, dont le caryotype varie rapidement après traitement au nocodazole, ont perdu cette capacité de régulation, tandis que les cellules de type MIN l'ont conservé. On peut faire l'hypothèse que l'aneuploïdie ne permet de développer l'instabilité chromosomique que dans le cas où les cellules ont préalablement subies des mutations qui empêchent l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence.

Les résultats que nous avons obtenus nous permettent d'envisager plusieurs voies importantes pour la poursuite de ce projet. Certains points restent à éclaircir pour comprendre l'arrêt des cellules aneuploïdes. Le premier point est celui de la signalisation qui est nécessaire à l'arrêt des cellules aneuploïdes. Il paraît important de clarifier le rôle de p53 et de pRb, et de savoir quelle est l'importance relative de chacune de ces deux voies, ainsi que le rôle de p21^{Cip1} et de p27^{Kip1}. Le deuxième point est celui de l'activation du point de contrôle mitotique et du délai de sortie de mitose qu'elle induit. Il serait intéressant de savoir si cette activation joue un rôle dans la mise en place d'une réponse cellulaire post-mitotique. Enfin, le troisième point est celui des mécanismes permettant d'échapper au point de contrôle mitotique en présence d'anomalies. Il serait intéressant de savoir quelles sont les conditions biochimiques dans lesquelles les cellules sortent de mitose afin de savoir s'il s'agit d'une adaptation, d'une lacune ou d'une régulation physiologique du point de contrôle mitotique. Il serait important par la suite de déterminer si les conditions de la sortie de mitose en cas d'anomalies jouent un rôle dans la réponse cellulaire post-mitotique. Ces deux derniers points sont discutés dans les chapitres suivants.

7.2 L'importance des différents stress et point de contrôle dans nos résultats

Il est possible que le phénotype que nous observons soit le résultat de l'activation de voies de signalisation activées par des dommages ou des stress. Dans le cadre de l'approche pharmacologique, les cellules aneuploïdes sont des cellules qui ont subi un stress et un arrêt en

mitose susceptible d'activer la réponse cellulaire post-mitotique observée. Chez les mammifères supérieurs, les inhibiteurs des microtubules activent deux points de contrôle, le point de contrôle de l'antéphase et le point de contrôle mitotique (Scolnick and Halazonetis 2000; Mikhailov, Shinohara et al. 2005; Musacchio and Salmon 2007).

Il est possible que l'activation du point de contrôle mitotique et le délai de sortie de mitose aient un rôle dans l'arrêt des cellules aneuploïdes. En effet, l'importance du point de contrôle mitotique dans l'arrêt en G1 dû au *post-mitotic checkpoint* après traitement avec du nocodazole est déjà connu (Vogel, Kienitz et al. 2004). Il a été publié que le point de contrôle mitotique est important pour la stabilisation de p53 nécessaire au *post-mitotic checkpoint*. p53 est phosphorylée dans les cellules tétraploïdes après traitement au nocodazole, et cette phosphorylation semble être dépendante en particulier de la protéine BubR1 (Ha, Baek et al. 2007). Il a été suggéré que le délai observé par les cellules en mitose dans le cas de l'activation du point de contrôle est important pour la réponse post-mitotique de ces cellules (Blagosklonny 2006). Le point de contrôle mitotique et le délai de sortie de mitose subi par les cellules est aussi nécessaire au déclenchement de l'apoptose dans les lignées cellulaires qui y sont sujettes (Taylor and McKeon 1997). L'activation du point de contrôle mitotique dans le cas de nos expériences et des cellules aneuploïdes pourrait jouer un rôle indirectement en créant un arrêt ou un délai en mitose susceptible de créer un stress.

Le point de contrôle de l'antéphase, un point de contrôle du cycle cellulaire sensible aux inhibiteurs des microtubules qui nécessite à la fois la protéine Chfr et l'activation de p38MAPK (Scolnick and Halazonetis 2000; Mikhailov, Shinohara et al. 2005), induit un retard de l'entrée en mitose, voire un arrêt en phase G2, des cellules. On ignore cependant s'il existe, comme pour le point de contrôle mitotique, une réponse cellulaire post-mitotique à ce point de contrôle lorsqu'il est activé. Il serait intéressant de savoir, dans le cadre de nos expériences, si ce point de contrôle est activé et s'il joue un rôle dans la réponse cellulaire des cellules aneuploïdes.

7.3 L'adaptation ou le « slippage » et la réponse cellulaire.

Le protocole que nous avons utilisé pour générer des cellules aneuploïdes induit une activation du point de contrôle mitotique. Les cellules progressent néanmoins en anaphase sans avoir réparé leurs erreurs. Une explication pourrait être que les cellules échappent au point de contrôle. Lorsque les cellules sont cultivées en présence de fortes concentrations de nocodazole, elles restent arrêtées en mitose puis finissent par sortir de mitose sans avoir séparé leurs chromosomes. Ce phénomène, le *mitotic slippage* a été décrit et il ne dépend pas d'un phénomène d'adaptation (Rieder and Maiato 2004; Brito and Rieder 2006). Il se produit par une dégradation de la Cycline B, et ce alors que les protéines du point de contrôle mitotique restent localisées au niveau des kinétochores, et donc à priori actives. Ce phénomène s'accompagne aussi de modification du métabolisme des cellules. En effet, au cours d'une mitose normale, la transition métaphase/anaphase marque le moment du début de l'activité du complexe APC/C-Cdh1 qui permet la dégradation d'un grand nombre de protéines mitotiques. Dans le cas du *mitotic slippage*, certaines protéines cibles de APC/C-Cdh1 ne sont pas dégradées dans les cellules tétraploïdes arrêtées en G1 alors qu'elles le sont dans des cellules ayant suivi une mitose normale (Bruto and Rieder 2006). D'autres études ont montré que les cellules tétraploïdes arrêtées sont dans une phase biochimiquement distincte de la phase G1 classique (Mantel, Guo et al. 2008). L'ordre dans lequel les protéines sont ciblées par l'ubiquitine ligase APC/C et leur dégradation sont finement régulés (Lindon and Pines 2004). La question reste entière de savoir dans quelle mesure la modification biochimique après *mitotic slippage* intervient dans l'arrêt des cellules tétraploïdes. En ce qui concerne les cellules aneuploïdes, il serait intéressant de savoir si la façon dont elles échappent ou bien s'adaptent au point de contrôle se traduit aussi par une modification de leur métabolisme, notamment par une modification de la régulation de la dégradation des protéines, et si cette modification joue un rôle dans l'arrêt post-mitotique et la sénescence qui l'accompagne.

Matériels et Méthodes

8 Matériel

8.1 Lignées cellulaires utilisées

Pour mes travaux j'ai utilisé les lignées cellulaires décrites dans les paragraphes suivant.

REF52

Les cellules REF52 sont des cellules embryonnaires de rat. Ces cellules sont des cellules primaires de type fibroblaste, non transformées ou immortalisées. Elles sont maintenues en culture jusqu'à 60 passages, à partir de quand elles commencent à devenir sénescents. Dans le cadre de mon travail, j'ai utilisé ces cellules à des passages inférieurs à 30. Les REF52 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec du sérum fœtal bovin (10 % v/v final).

GPEX

Les GPEX sont des cellules d'emballage de rétrovirus humains fournies par M. Oren (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israël). Ces cellules ont intégré de façon stable dans leur génome les gènes viraux *gag*, *pol*, *env* et permettent l'emballage de virions défectifs pour la multiplication. Ces cellules produisent des virions LXS_N-p53DD exprimant le gène de résistance à la néomycine ainsi qu'une forme mutée de la protéine p53, p53DD. P53DD est un dominant négatif de p53 qui ne comprend que la séquence d'oligomérisation de la protéine. P53 et p53DD forment des oligomères incapables d'activer la transcription des gènes. Les cellules GPEX sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec du sérum fœtal bovin (10 % v/v final) et contenant du G418 (généticine) à 200 µM.

REF52-p53DD

Les cellules REF52-p53DD sont des cellules REF52 infectées par le virus murin LXS_N-p53DD. Les REF52-p53DD sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec du sérum fœtal bovin (10 % v/v final) et contenant du G418 (généticine) à 200 µM.

TAG

Les cellules TAG sont des cellules REF52 qui ont été transformées par l'antigène grand T de SV40 (*Simian Vacuolating Virus 40 TAG*). L'antigène grand T de SV40 interagit avec les

fonctions des protéines p53 et pRb dites protéines suppresseur de tumeur. Les TAG sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec du sérum fœtal bovin (10 % v/v final).

IMR90

Les cellules IMR90 sont des fibroblastes humains primaires issus du poumon d'un embryon normal de 16 semaines. Les cellules que j'ai utilisé ont été obtenue de l'ATCC (American Type Culture Collection) Ces cellules sont maintenues en cultures jusqu'à environ 60 passages, à partir de quand elles commencent à devenir sénescentes, dans le cadre de ma recherche j'ai utilisé des cellules dont le nombre de passages était toujours inférieur à 30. Les IMR 90 sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec du sérum fœtal bovin (10 pourcent v/v final).

8.2 Anticorps utilisés

8.2.1 Anticorps primaires

Les anticorps primaires que j'ai utilisés sont décrits dans le tableau suivant.

	isoforme ou amino acid de la protéine reconnue	numero du clone/nom de l'anticorps	origine
BrDU	reconnaît la molécule de Bromodeoxyuridine	Bu20a	DakoCytomation
Bub1	reconnaît l'homologue humain de la protéine Bub1	14H5	Sigma
Cyclin B1	reconnaît l'homologue humain et faiblement l'homologue souris de la protéine CyclineB1		Upstate
Phospho Histone H2AX	reconnaît l' homologue humain de la protéine Histone H3 phosphorylée sur la Serine 139	JBW301	Upstate
MPM2	reconnaît un epitope phosphorylé retrouvé sur plusieurs protéines phosphorylées en début de mitose.		Upstate

p21^{Cip1}	reconnaît les homologues humain, souris et rat de la protéine p21/ Cip1/ Waf1	sx118	BD Pharmingen
p27^{Kip1}	reconnaît les homologues humain, souris et rat de la protéine p27 Kip1		BD Transduction laboratories
Phospho p38 MAPK-Thr180/Tyr182	reconnaît les homologues humain, souris et rat de la protéine p38 MAPK phosphorylées au niveau des résidus thréonine 180 et/ou tyrosine 182		Cell Signalling Technology
p53	reconnaît les homologues humain, souris et rat de la protéine p53		Cell Signalling Technology
Tubuline (alpha)	reconnaît les homologues humain, souris et rat de la protéine alpha-Tubuline	B512	Sigma
Vinculin	reconnaît les homologues humain, souris et rat de la protéine Vinculine	VIN-115	Sigma

8.2.2 Anticorps secondaires

Tous les anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence proviennent de Jackson Immunoresearch Laboratories. Deux espèces d'origine des anticorps secondaires ont été utilisées : chèvre et âne. Les anticorps secondaires utilisés peuvent être couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, émet dans le vert) ou à la cyanine 3 (Cy3, émet dans le rouge). Ces anticorps ont été utilisés à la dilution de 1/500.

Les anticorps secondaires utilisés pour l'immunodétection des protéines pour la biochimie proviennent de Pierce. Ces anticorps sont couplés à l'enzyme HRP et sont utilisés à la dilution de 1/10 000.

8.3 Milieux de culture et tampons utilisés

Pour mes travaux j'ai utilisé les milieux de culture et tampons suivants :

DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium), supplémenté avec du glucose (4.5 g/L) de la L-glutamine et du piruvate de sodium, obtenu de Cellgro (Mediatech)

PBS (Phosphate Buffered Saline) optenu de Cellgro (Mediatech)

HEPES optenu de Cellgro (Mediatech)

Trypsine-EDTA, optenu de Cellgro (Mediatech)

TN (Tris-NaCl)

Composé	Concentration finale
Tris base pH 7,5	25 mM
NaCl	150 mM

FBS (Sérum foetal Bovin), optenu de Cellgro

BCS (Sérum de veau), optenu de Cellgro

Tampon anticorps

Composé	Concentration finale
PBS	1X
Tween 20	0,05% v/v
Albumine bovine sérique	3% p/v
Azide de sodium	0,025% p/v

Tampons de transferts

Tampon A

Composé	Concentration finale
Tris base	25 mM
Isopropanol	20% v/v
Acide aminocaproïque	40 mM

Tampon B

Composé	Concentration finale
Tris base	25 mM
Isopropanol	20 % v/v

Tampon C

Composé	Concentration finale
Tris base	250 mM
Isopropanol	20% v/v

Tampon d'électrophorèse

Composé	Concentration finale
Tris base	25 mM
Glycine	200 mM
SDS	1% v/v

Tampon de perméabilisation pour microscopie

Avant immunomarquage les cellules fixées avec du formaldéhyde sont perméabilisées par immersion dans une solution de PBS contenant 0,2% de Triton X-100.

Tampon de lyse

Composé	Concentration finale
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	250 mM
NP40	0,1% v/v

Glycerol	10 % v/v
EGTA	5 mM
NaF	50 mM
Glycerol-2-Phosphate	60 mM
PMSF	0,1 mM
Aprotinine	10 µg/mL
Leupeptine	10 µg/mL
Vanadate de sodium	0,5 mM

Tampon de dénaturation

Composé	Concentration finale
Tris-HCl	50 mM
SDS	2% (p/v)
DTT	100 mM
Glycérol	10% (v/v)
Bleu de Bromophénol	0,1% (p/v)

Le tampon de dénaturation est ajusté à pH 6,8

8.4 Inhibiteurs utilisés

Aphidicholine

Propriétés : Inhibiteur des ADN Polymerases alpha et delta chez les eukaryotes.

Utilisations : De part ses propriétés, a été utilisé pour synchroniser les populations de cellules eucaryotes en culture à la transition entre phase G1 et phase S.

Mode d'action : L'inhibition des ADN polymerases alpha et delta a une certaine concentration et pendant un certain temps prévient la réplication de l'ADN. Cette inhibition active un point de contrôle lié à la réplication de l'ADN qui arrête les cellules de façon réversible au début de la phase S du cycle cellulaire.

Conditions d'utilisation : Utilisé dans le milieu de culture à 5 μ M pendant 12 à 16 heures. Le milieu est ensuite aspiré et les cellules sont lavées trois fois pendant 1 minutes avec du PBS à température ambiante

Conditions de stockage : Le composé est dissout dans du DMSO à la concentration de 5 mM et stocké à -20°C jusqu'à trois mois après reconstitution.

Origine : Calbiochem

Dihydrocytochalasine B (DCB)

Propriétés : Composé interférant avec l'actine

Conditions de stockage : Le composé est dissout dans du DMSO à la concentration de 2mM et stocké à -20°C.

Origine : Calbiochem

Methyl-(5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate (Nocodazole)

Propriétés : Composé interférant avec la dynamique de polymérisation et dépolymérisation des microtubules. Intéragit avec la Tubuline- β et empêche la polymérisation des microtubules.

Conditions d'utilisation : Dans le cadre de mon travail j'ai utilisé des concentrations de Nocodazole (dans le milieu de culture) variant de 33 à 332 nM.

Conditions de stockage : Le composé est dissout dans du DMSO à la concentration de 1mg/mL et stocké à -20°C.

Origine : Sigma

Paclitaxel (Taxol)

Propriétés : Composé interférant avec la dynamique de polymérisation et dépolymérisation des microtubules

Conditions d'utilisation : Dans le cadre de mon travail j'ai utilisé des concentrations de Taxol (dans le milieu de culture) variant de 10 nM à 400 nM

Conditions de stockage : Le composé est dissout dans du DMSO à la concentration de 10 mM et stocké à -20°C. Une concentration intermédiaire de 10 μ M dans du milieu DMEM sans sérum est utilisée et conservée à -20°C

Origine : Sigma

Vinblastine Sulfate (Vinblastine)

Propriétés : Composé interférant avec la dynamique de polymérisation et dépolymérisation des microtubules

Mode d'action : Modifie l'interaction entre les molécules de Tubuline et certaines protéines MAP, en particulier les protéines Tau et MAP2 , associées aux microtubules et régulant la dynamique de polymérisation. A fortes concentrations, dépolymérise les microtubules.

Conditions d'utilisation : Dans le cadre de mon travail j'ai utilisé des concentrations de Vinblastine (dans le milieu de culture) variant de 1 nM à 50 nM

Conditions de stockage : Le composé est dissout dans du DMSO à la concentration de 10 mM et stocké à -20°C. Une concentration intermédiaire de 10 µM dans de l'eau bi distillée est utilisée et conservée à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à deux semaines.

Origine : Calbiochem

SB 203580

Propriétés : Inhibiteur de la protéine kinase p38 MAPK

Conditions de stockage : Le composé est dissout dans du DMSO à une concentration de 1mM et conservé à -20°C

Origine : Calbiochem

S-trityl-L-cystéine (STLC)

Propriétés : Inhibe l'activité de la kinésine Eg5.

Utilisations : Utilisé pour arrêter les cellules en culture en phase M à la transition métaphase-anaphase

Conditions de stockage : Le composé est dissout dans du DMSO à une concentration de 50mM et conservé à -20°C

Origine : Calbiochem

9 Méthodes

9.1 Culture cellulaire

Les cellules décrites précédemment étaient cultivées dans un incubateur humide maintenu à 37°C, en présence de 5 pourcent de dioxyde de carbone à une densité inférieure à la confluence. Le milieu était changé tout les trois jours. Les cellules étaient cultivées entre 40% et 80% de confluence, et étaient passées à 80% de confluence. Toutes les étapes de la culture cellulaire s'effectuent en conditions et avec des produits stériles sous une hôte à flux laminaire.

Passage des cellules :

Le milieu de culture des cellules est aspiré et remplacé par du PBS 1X préchauffé à 37°C

Le PBS est aspiré et remplacé par 1 ml de trypsine–EDTA préchauffée à 37°C.

Les cellules sont placées pendant 1 à 5 minutes dans l'incubateur, à 37°C.

Un volume adéquat (variant en fonction de la densité désirée dans les nouvelles boîtes de culture) de milieu de culture préchauffé est rajouté à la trypsine contenant les cellules. Les cellules sont séparées et resuspendues dans le milieu par pipetage.

La quantité appropriée de cellules estensemencée dans les nouvelles boîtes de culture cellulaire.

Le comptage des cellules et l'évaluation de la viabilité des cellules avant ensemencement s'effectue avec un hematocytomètre de type Mallassez. Deux dilutions différentes de cellules dans du PBS contenant 0.1 pourcent de bleu trypan sont comptées à l'aide du microscope.

9.2 Techniques de biologie cellulaire

9.2.1 Synchronisation des cultures cellulaires

9.2.1.1 *Enrichissement en cellules en phase G0/G1*

9.2.1.1.1 La privation de sérum

La privation partielle de sérum induit un arrêt des cellules en phase G1, avant le point de restriction. Les cellules en culture sont lavées trois fois avec du PBS 1X stérile et préchauffé à

37°C puis incubées pendant 24 heures dans du milieu contenant 0,1% de sérum. Le retour à des conditions de culture avec 10% de sérum stimule l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire.

9.2.1.1.2 L'inhibition de contact

Les cellules de lignées cellulaires ayant conservé leur capacité d'inhibition de contact s'arrêtent en phase G0/G1 lorsqu'elles deviennent confluentes. Le passage des cellules dans de nouvelles boîtes de culture à une densité plus faible stimule l'entrée dans le cycle cellulaire.

9.2.1.2 *Enrichissement de cellules en phase G1/S*

9.2.1.2.1 L'aphidicoline

L'aphidicoline est un inhibiteur des ADN Polymérase alpha et delta chez les eucaryotes. L'inhibition des ADN polymérase alpha et delta à une certaine concentration et pendant un certain temps prévient la réplication de l'ADN. Cette inhibition active un point de contrôle lié à la réplication de l'ADN qui arrête les cellules de façon réversible au début de la phase S du cycle cellulaire. Dans le cadre de mes travaux j'ai utilisé l'aphidicoline dans le milieu de culture à 5 µM pendant 12 à 16 heures. Le milieu est ensuite aspiré et les cellules sont lavées trois fois pendant 1 minutes avec du PBS préchauffé à 37°C.

9.2.2 Prolifération cellulaire

Les mesures en cytométrie de flux ont été réalisées avec un appareil FACScalibur de Becton-Dickinson et les données récoltées ont été analysées avec le programme Flow-Jo.

9.2.2.1 *Mesure de la quantité d'ADN des cellules par cytométrie de flux*

Les protocoles que nous avons utilisés pour les différentes études en cytométrie de flux nécessitent la fixation préalable des cellules.

Fixation :

Les boîtes de cultures sont rincées au PBS, puis les cellules sont détachées par trypsinisation. Les cellules sont centrifugées à 230 g pendant 3 minutes à 37°C en présence du PBS de rinçage et du milieu dans lequel elles étaient. Les liquides sont éliminés, le culot est resuspendu dans 1ml de PBS auquel est rajouté 9ml de méthanol absolu froid (-20°C). Les cellules sont ensuite placées à -20°C pendant au moins 20 minutes.

Avant le marquage, les cellules fixées sont centrifugées à 230 g pendant 5 minutes, le mélange PBS/méthanol est éliminé et les cellules sont rincées une fois avec 2ml de PBS puis centrifugées à nouveau.

Marquage :

Les cellules sont resuspendues dans 500 µL d'une solution de RNase contenant 50 µg/ml d'iodure de propidium puis incubées 15 minutes dans un bain marie à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de 14 µL de NaCl 5M. Les tubes sont ensuite conservés à 4°C.

Tampon citrate

Composé	Concentration finale
Citrate de sodium	8mM
Triton X-100	0,2%
Eau bi-distillée	qsp 50ml

Solution de RNase

Composé	Concentration finale
Tampon Citrate	50%
RNase 60 U/ml	50%

9.2.2.2 Mesure de l'incorporation de BrdU par cytométrie de flux ou par microscopie

Pour étudier l'incorporation de BrdU dans les cellules, celles-ci doivent être incubées en présence de BrdU préalablement à la fixation. J'ai utilisé la BrdU dans le milieu à une concentration finale de 20 μ M et les cellules ont été incubées pendant 2 heures en présence de BrdU avant d'être fixées. Avant fixation, les cellules ont été lavées une fois 1 minute avec du PBS préchauffé. Les cellules ont ensuite été fixées comme décrit préalablement.

Marquage :

Après rinçage, les cellules sont resuspendues dans 1ml d'une solution de 2N HCl /0,5% Triton X-1 pendant 30 minutes à température ambiante, puis centrifugées et immédiatement neutralisées par resuspension dans 1ml d'une solution de tetraborate de sodium 0,1 M pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite incubées dans 1ml de Tampon anticorps additionné de 5% de serum de chèvre. Les cellules sont ensuite incubées dans 100 μ L de l'anticorps primaire anti-BrdU dilué au 1/500^{ième} dans du tampon anticorps à 4°C pendant la nuit. Les cellules sont ensuite lavées une fois avec du PBS 1X puis incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la molécule fluorescente FITC dilué au 1/500^{ième} pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois comme précédemment. Les cellules peuvent être marquées avec de l'iodure de propidium qui se lie aux acides nucléiques pour déterminer leur contenu en ADN.

9.2.2.3 Mesure de marqueurs spécifiques à la mitose par cytométrie de flux

9.2.2.3.1 MPM2

L'anticorps anti MPM2 reconnaît un épitope phosphorylé retrouvé sur plusieurs protéines phosphorylées en début de mitose et déphosphorylées à partir de la transition métaphase/anaphase.

Marquage :

Pour l'analyse des cellules par cytométrie de flux, les cellules préalablement fixées au méthanol froid sont centrifugées 5 minutes à 300g, lavées une fois avec du PBS, centrifugées à nouveau de la même façon. Les cellules sont incubées dans 100 µL de l'anticorps dilué au 1/500^{ième} dans du tampon anticorps à 37°C pendant une heure. Les cellules sont lavées une fois avec du PBS 1X comme précédemment, puis incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la molécule fluorescente FITC dilué au 1/500^{ième} pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées deux fois comme précédemment. Les cellules peuvent être marquées avec de l'iodure de propidium qui se lie aux acides nucléiques pour déterminer leur contenu en ADN.

9.2.2.4 *Activité de la β-galactosidase à pH=6*

Afin de mesurer l'effet des inhibiteurs des microtubules sur l'induction de la senescence, les cellules ont tout d'abord été incubées en présence de différents inhibiteurs pendant 6 jours.

Les cellules ont ensuite été fixées et marquées en utilisant le kit « Senescence beta-Galactosidase Staining Kit #9860 » de Cell Signaling et en suivant le protocole fourni.

9.2.3 *Techniques de biochimie : analyse des protéines par western blot*

9.2.3.1 *Lyse des cellules et extraction des protéines totales*

Les cellules sont récoltées par trypsinisation, centrifugées pendant 3 minutes et rincées avec du PBS froid (4°C), centrifugées à nouveau pendant 10 minutes à 4°C, et le culot est resuspendu dans du tampon de lyse (voir Matériel) et laissé sur glace pendant 30 minutes. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation (30 minutes à 21 000 g à 4°C). Le surnageant est utilisé directement.

La concentration protéique des extraits est déterminée selon la méthode de Bradford en utilisant le réactif Protein Assay de Biorad. Une gamme étalon de BSA comprise entre 15 µg/ml et 0,5 µg/ml sert de référence. Les échantillons à doser sont

préparés comme suit : 150 µL d'eau bi-distillée, 10 µL de la gamme d'échantillon, 40 µL de réactif Biorad. Après 15 minutes, la densité optique est mesurée à 595 nm avec un lecteur de plaques ELISA Biorad. La concentration des échantillons est déterminée par rapport à la courbe étalon.

9.2.3.2 Préparation des échantillons

Les échantillons protéiques sont préparés à 4°C à partir des extraits cellulaires repris dans du tampon de dénaturation et du tampon de lyse de façon à ce que tous les échantillons aient une concentration identique. Les échantillons sont ensuite chauffés à 95°C pendant 3 minutes puis centrifugés quelques secondes à 110 rpm. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits des gels de polyacrylamide.

9.2.3.3 Electrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante

Les gels de polyacrylamide sont coulés entre 2 plaques de verre montées dans un système Biorad. Ils se composent d'un gel de concentration et d'un gel de séparation préparés selon les protocoles ci-dessous. Le gel de séparation est coulé puis sa surface est égalisée à l'aide d'une solution de SDS à 0,2%. Une fois que le gel a polymérisé, la solution de SDS est éliminée et le gel de concentration est coulé et recouvert d'un peigne. Lorsque le gel de concentration est polymérisé, les plaques sont placées dans un appareil Biorad et immergées dans du tampon d'électrophorèse (voir matériel).

Gels de séparation

Pourcentage d'acrylamide	7,5%	12%	15%
Solution d'acrylamide (30% acrylamide, 0,8% bisacrylamide)	1,25 ml	2 ml	2,5 ml
Solution de Tris 1,5M pH 8,8 - 0,4 %SDS	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
Eau bi-distillée	2,5 ml	2 ml	1,25 ml
Solution de persulfate d'ammonium 10%	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
Temed	0,01 ml	0,01 ml	0,01 ml

Gel de concentration

Solution d'acrylamide (30% acrylamide, 0,8% bisacrylamide)	400 µL
Solution de Tris 0,5M pH 6,8 - 0,4 %SDS	625 µL
Eau bi-distillée	1,45 ml
Solution de persulfate d'ammonium 10%	80 µL
Temed	8 µL

Une fois les échantillons déposés, l'appareil Biorad est mis sous tension de façon à ce que les protéines des échantillons migrent. La migration s'effectue le plus souvent à la tension constante de 50 Volts dans le gel de concentration, puis de 90 Volts dans le gel de séparation.

9.2.3.4 *Electrotransfert sur membrane de nitrocellulose*

Après électrophorèse, les protéines sont transférées des gels vers une membrane qui servira de support pour le western blot. J'ai utilisé pour membrane de la nitrocellulose. Pour le transfert, le gel de protéines est déposé sur 6 épaisseurs de papier Whatman imbibées de tampon de transfert A (matériel). Le gel est ensuite recouvert de la membrane de cellulose humidifiée dans le tampon de transfert B, puis de 3 épaisseurs de papier Whatman imbibées dans le tampon de transfert B, puis de 6 épaisseurs de papier Whatman imbibées dans le tampon de transfert C. Le sandwich est placé dans l'appareil de transfert de façon à ce que la membrane se trouve entre le gel de protéines et la cathode. L'appareil est mis sous tension et le transfert se fait à intensité constante (40 mA).

9.2.3.5 *Immunodétection des protéines*

Après transfert, la membrane est rincée rapidement avec de l'eau distillée, puis bloquée dans une solution de TN (voir matériel) additionnée de 5% de lait écrémé en poudre ou de 5% de BSA selon les anticorps à utiliser, et de 0,1% de Tween 20.

La membrane est ensuite incubée en présence de l'anticorps spécifique de la protéine à détecter dilué dans une solution de TN additionnée de lait écrémé en poudre (variable selon l'anticorps primaire utilisé) et de 0,1% Tween 20 pendant la nuit à 4°C sous agitation. L'anticorps primaire est lavé quatre fois pendant 10 minutes dans une solution de TN additionnée de 0,2% de Tween 20 sous agitation. La membrane est ensuite incubée en présence de l'anticorps secondaire, couplé à l'enzyme HRP, dilué à 1/10 000, pendant 1 heure à température ambiante sous agitation. La membrane est ensuite rincée quatre fois pendant 5 minutes avec la même solution de rinçage que précédemment. La révélation du marquage se fait par réaction enzymatique avec la solution commerciale d'ECL (Enhanced Chemiluminescence) d'Amersham pendant 5 minutes. La réaction enzymatique est détectée sur film radiographique Amersham.

9.2.4 Techniques de microscopie

9.2.4.1.1 Culture de cellules sur support adapté

Pour les expériences nécessitant des analyses microscopiques, les cellules sont cultivées sur les lamelles de verre traitées spécifiquement. Les lamelles de verre sont nettoyées dans une solution de HCl 1N pendant 4 heures, puis rincées plusieurs fois avec de l'eau bi-distillée. Les lamelles sont ensuite incubées dans une solution de poly-L-lysine à 0,2 mg/ml pendant une heure. Les lamelles sont à nouveau lavées plusieurs fois avec de l'eau bi-distillée puis stérilisées dans une solution d'éthanol à 70% pendant 30 minutes. Les lamelles sont mises à sécher sous hotte laminaire et rincées une fois dans une solution d'éthanol 90%, puis laissées à sécher sous la hotte pendant une nuit, protégées de la lumière.

9.2.4.1.2 Fixations

Les cellules sont fixées soit avec du méthanol froid, soit avec du formaldéhyde, selon les marquages qui seront effectués par la suite et la susceptibilité des anticorps primaires utilisés.

Fixation au formaldéhyde : les lamelles sont immergées dans une solution de PBS contenant 2% de formaldéhyde à 37°C pendant 20 minutes puis rincées trois fois avec du PBS pendant 5 minutes. Elles sont conservées à 4°C pendant une nuit maximum.

Fixation au méthanol : les lamelles sont immergées dans du méthanol froid (conservé à -20°C) et conservées à -20°C jusqu'au marquage.

9.2.4.1.3 Perméabilisation

Les cellules fixées avec du formaldéhyde sont perméabilisées par immersion dans le tampon de perméabilisations (voir Matériel) pendant 3 minutes. Les cellules sont ensuite rincées trois fois avec du PBS.

9.2.4.1.4 Immunodétection des protéines

Les lamelles fixées et perméabilisées sont recouvertes d'une solution de l'anticorps primaire dilué dans du tampon anticorps (voir matériel). Selon l'anticorps, la dilution et les conditions de l'incubation peuvent varier. Pour la Tubuline- α , l'anticorps est dilué à 1/1000 et les lamelles sont incubées à température ambiante pendant deux heures. Les lamelles sont ensuite rincées trois fois avec du PBS. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire dilué à 1/500 dans du tampon anticorps pendant 1 heure à température ambiante. Les lamelles sont lavées trois fois avec du PBS avant d'être montées sur lame.

9.2.4.1.5 Marquage de l'ADN

Les lamelles fixées et perméabilisées sont incubées pendant 5 minutes dans une solution de PBS contenant de l'iodure de propidium à 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puis rincées trois fois avec du PBS. Dans le cas de cellules fixées au formaldéhyde, une incubation préalable dans une solution contenant 10 UI/ml de RNase est nécessaire.

9.2.4.1.6 Montage sur lame des lamelles

Les lamelles sont montées sur les lame avec du milieu de montage Pro-Long Gold d'Invitrogen. L'observation a été faite sur soit à l'aide d'un microscope Nikon équipé du système Bio-rad Confocal Imaging système MRC-600, soit avec un microscope inversé Olympus équipé du système de traitement d'image DeltaVision Core Deconvolution.

Références Bibliographiques

10 Références bibliographiques

- Acquaviva, C., F. Herzog, et al. (2004). "The anaphase promoting complex/cyclosome is recruited to centromeres by the spindle assembly checkpoint." *Nat Cell Biol* **6**(9): 892-8.
- Acquaviva, C. and J. Pines (2006). "The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C." *J Cell Sci* **119**(Pt 12): 2401-4.
- Adams, R. R., S. P. Wheatley, et al. (2000). "INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow." *Curr Biol* **10**(17): 1075-8.
- Ahuja, D., M. T. Saenz-Robles, et al. (2005). "SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation." *Oncogene* **24**(52): 7729-45.
- Akhmanova, A. and M. O. Steinmetz (2008). "Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4): 309-22.
- Alberts, B. e. a. (2002). *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science.
- Alexander, K. and P. W. Hinds (2001). "Requirement for p27(KIP1) in retinoblastoma protein-mediated senescence." *Mol Cell Biol* **21**(11): 3616-31.
- Almagro, S., D. Riveline, et al. (2004). "The mitotic chromosome is an assembly of rigid elastic axes organized by structural maintenance of chromosomes (SMC) proteins and surrounded by a soft chromatin envelope." *J Biol Chem* **279**(7): 5118-26.
- Amann, K. J. and T. D. Pollard (2000). "Cellular regulation of actin network assembly." *Curr Biol* **10**(20): R728-30.
- Andreassen, P. R., O. D. Lohez, et al. (2001). "Tetraploid state induces p53-dependent arrest of nontransformed mammalian cells in G1." *Mol Biol Cell* **12**(5): 1315-28.
- Andreassen, P. R. and R. L. Margolis (1994). "Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells." *J Cell Biol* **127**(3): 789-802.
- Andreassen, P. R., S. N. Martineau, et al. (1996). "Chemical induction of mitotic checkpoint override in mammalian cells results in aneuploidy following a transient tetraploid state." *Mutat Res* **372**(2): 181-94.
- Aslanian, A., P. J. Iaquina, et al. (2004). "Repression of the Arf tumor suppressor by E2F3 is required for normal cell cycle kinetics." *Genes Dev* **18**(12): 1413-22.
- Assoian, R. K. (1997). "Anchorage-dependent cell cycle progression." *J Cell Biol* **136**(1): 1-4.
- Assoian, R. K. and X. Zhu (1997). "Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression." *Curr Opin Cell Biol* **9**(1): 93-8.
- Azimzadeh, J. and M. Bornens (2007). "Structure and duplication of the centrosome." *J Cell Sci* **120**(Pt 13): 2139-42.
- Bagshaw, C. R. (2000). "Motors in muscle: the function of conventional myosin II." *Essays Biochem* **35**: 19-31.
- Bahassi el, M., C. W. Conn, et al. (2002). "Mammalian Polo-like kinase 3 (Plk3) is a multifunctional protein involved in stress response pathways." *Oncogene* **21**(43): 6633-40.
- Bahe, S., Y. D. Stierhof, et al. (2005). "Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion." *J Cell Biol* **171**(1): 27-33.
- Baker, D. J., K. B. Jeganathan, et al. (2004). "BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice." *Nat Genet* **36**(7): 744-9.
- Baker, D. J., K. B. Jeganathan, et al. (2006). "Early aging-associated phenotypes in Bub3/Rae1 haploinsufficient mice." *J Cell Biol* **172**(4): 529-40.
- Baker, D. J., C. Perez-Terzic, et al. (2008). "Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency." *Nat Cell Biol* **10**(7): 825-36.
- Ban, K. H., J. Z. Torres, et al. (2007). "The END network couples spindle pole assembly to inhibition of the anaphase-promoting complex/cyclosome in early mitosis." *Dev Cell* **13**(1): 29-42.
- Barr, A. R. and F. Gergely (2007). "Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles." *J Cell Sci* **120**(Pt 17): 2987-96.
- Barros, T. P., K. Kinoshita, et al. (2005). "Aurora A activates D-TACC-Msps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules." *J Cell Biol* **170**(7): 1039-46.
- Bastiaens, P., M. Caudron, et al. (2006). "Gradients in the self-organization of the mitotic spindle." *Trends Cell Biol* **16**(3): 125-34.
- Basu, R. and F. Chang (2007). "Shaping the actin cytoskeleton using microtubule tips." *Curr Opin Cell Biol* **19**(1): 88-94.

- Belmont, L., T. Mitchison, et al. (1996). "Catastrophic revelations about Op18/stathmin." *Trends Biochem Sci* **21**(6): 197-8.
- Besson, A., S. F. Dowdy, et al. (2008). "CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond." *Dev Cell* **14**(2): 159-69.
- Blagosklonny, M. V. (2006). "Prolonged mitosis versus tetraploid checkpoint: how p53 measures the duration of mitosis." *Cell Cycle* **5**(9): 971-5.
- Blank, M. and Y. Shiloh (2007). "Programs for cell death: apoptosis is only one way to go." *Cell Cycle* **6**(6): 686-95.
- Bloom, J. and F. R. Cross (2007). "Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(2): 149-60.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, et al. (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." *Science* **279**(5349): 349-52.
- Bolton, M. A., W. Lan, et al. (2002). "Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation." *Mol Biol Cell* **13**(9): 3064-77.
- Bosc, C., J. D. Cronk, et al. (1996). "Cloning, expression, and properties of the microtubule-stabilizing protein STOP." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(5): 2125-30.
- Bottazzi, M. E. and R. K. Assoian (1997). "The extracellular matrix and mitogenic growth factors control G1 phase cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors." *Trends Cell Biol* **7**(9): 348-52.
- Bottazzi, M. E., X. Zhu, et al. (1999). "Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase." *J Cell Biol* **146**(6): 1255-64.
- Brito, D. A. and C. L. Rieder (2006). "Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint." *Curr Biol* **16**(12): 1194-200.
- Buffin, E., C. Lefebvre, et al. (2005). "Recruitment of Mad2 to the kinetochore requires the Rod/Zw10 complex." *Curr Biol* **15**(9): 856-61.
- Burakov, A., O. Kovalenko, et al. (2008). "Cytoplasmic dynein is involved in the retention of microtubules at the centrosome in interphase cells." *Traffic* **9**(4): 472-80.
- Burgess, D. R. (2005). "Cytokinesis: new roles for myosin." *Curr Biol* **15**(8): R310-1.
- Buschhorn, B. A. and J. M. Peters (2006). "How APC/C orders destruction." *Nat Cell Biol* **8**(3): 209-11.
- Cahill, D. P., C. Lengauer, et al. (1998). "Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers." *Nature* **392**(6673): 300-3.
- Carazo-Salas, R. E., O. J. Gruss, et al. (2001). "Ran-GTP coordinates regulation of microtubule nucleation and dynamics during mitotic-spindle assembly." *Nat Cell Biol* **3**(3): 228-34.
- Carrier, M. F. (1998). "Control of actin dynamics." *Curr Opin Cell Biol* **10**(1): 45-51.
- Carrano, A. C., E. Eytan, et al. (1999). "SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27." *Nat Cell Biol* **1**(4): 193-9.
- Cassimeris, L. (1999). "Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle." *Curr Opin Cell Biol* **11**(1): 134-41.
- Cazales, M., E. Schmitt, et al. (2005). "CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage." *Cell Cycle* **4**(9): 1233-8.
- Cha, H., X. Wang, et al. (2007). "A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress." *J Biol Chem* **282**(31): 22984-92.
- Chan, T. A., H. Hermeking, et al. (1999). "14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage." *Nature* **401**(6753): 616-20.
- Chan, T. A., P. M. Hwang, et al. (2000). "Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint." *Genes Dev* **14**(13): 1584-8.
- Cheeseman, I. M., J. S. Chappie, et al. (2006). "The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore." *Cell* **127**(5): 983-97.
- Cheeseman, I. M., T. Hori, et al. (2008). "KNL1 and the CENP-H/I/K Complex Coordinately Direct Kinetochore Assembly in Vertebrates." *Mol Biol Cell* **19**(2): 587-94.
- Chen, R. H., A. Shevchenko, et al. (1998). "Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores." *J Cell Biol* **143**(2): 283-95.
- Chen, R. H., J. C. Waters, et al. (1996). "Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores." *Science* **274**(5285): 242-6.
- Cimini, D., B. Howell, et al. (2001). "Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells." *J Cell Biol* **153**(3): 517-27.
- Classon, M. and N. Dyson (2001). "p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets." *Exp Cell Res* **264**(1): 135-47.

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

Cobrinik, D. (2005). "Pocket proteins and cell cycle control." *Oncogene* **24**(17): 2796-809.

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

Corthesy-Theulaz, I., A. Pauloin, et al. (1992). "Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex." *J Cell Biol* **118**(6): 1333-45.

D'Avino, P. P., M. S. Savoian, et al. (2005). "Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy." *J Cell Sci* **118**(Pt 8): 1549-58.

Dalal, S. N., C. M. Schweitzer, et al. (1999). "Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site." *Mol Cell Biol* **19**(6): 4465-79.

David-Pfeuty, T., H. P. Erickson, et al. (1977). "Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5372-6.

De Antoni, A., C. G. Pearson, et al. (2005). "The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint." *Curr Biol* **15**(3): 214-25.

Decordier, I., E. Cundari, et al. (2008). "Mitotic checkpoints and the maintenance of the chromosome karyotype." *Mutat Res* **651**(1-2): 3-13.

DeGregori, J., T. Kowalik, et al. (1995). "Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes." *Mol Cell Biol* **15**(8): 4215-24.

Delacour-Larose, M., M. N. Thi, et al. (2007). "Role of survivin phosphorylation by aurora B in mitosis." *Cell Cycle* **6**(15): 1878-85.

DeLuca, J. G., W. E. Gall, et al. (2006). "Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1." *Cell* **127**(5): 969-82.

DeLuca, J. G., B. J. Howell, et al. (2003). "Nuf2 and Hec1 are required for retention of the checkpoint proteins Mad1 and Mad2 to kinetochores." *Curr Biol* **13**(23): 2103-9.

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

Desautels, M., J. P. Den Haese, et al. (2001). "Cdc4p, a contractile ring protein essential for cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*, interacts with a phosphatidylinositol 4-kinase." *J Biol Chem* **276**(8): 5932-42.

Di Fiore, B. and J. Pines (2007). "Emi1 is needed to couple DNA replication with mitosis but does not regulate activation of the mitotic APC/C." *J Cell Biol* **177**(3): 425-37.

Dimova, D. K. and N. J. Dyson (2005). "The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces." *Oncogene* **24**(17): 2810-26.

Ditchfield, C., V. L. Johnson, et al. (2003). "Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores." *J Cell Biol* **161**(2): 267-80.

Dodson, H., E. Bourke, et al. (2004). "Centrosome amplification induced by DNA damage occurs during a prolonged G2 phase and involves ATM." *Embo J* **23**(19): 3864-73.

dos Remedios, C. G., D. Chhabra, et al. (2003). "Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments." *Physiol Rev* **83**(2): 433-73.

Downing, K. H. and E. Nogales (1999). "Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding." *Cell Struct Funct* **24**(5): 269-75.

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

Doxsey, S., W. Zimmerman, et al. (2005). "Centrosome control of the cell cycle." *Trends Cell Biol* **15**(6): 303-11.

Duesberg, P., D. Rasnick, et al. (1999). "How aneuploidy may cause cancer and genetic instability." *Anticancer Res* **19**(6A): 4887-906.

Durocher, D. and S. P. Jackson (2001). "DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme?" *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 225-31.

Dutertre, S., M. Cazales, et al. (2004). "Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition." *J Cell Sci* **117**(Pt 12): 2523-31.

Ems-McClung, S. C., K. M. Hertzler, et al. (2007). "The interplay of the N- and C-terminal domains of MCAK control microtubule depolymerization activity and spindle assembly." *Mol Biol Cell* **18**(1): 282-94.

Escargueil, A. E. and A. K. Larsen (2007). "Mitosis-specific MPM-2 phosphorylation of DNA topoisomerase II α is regulated directly by protein phosphatase 2A." *Biochem J* **403**(2): 235-42.

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

- Fang, G., H. Yu, et al. (1998). "The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation." *Genes Dev* **12**(12): 1871-83.
- Field, S. J., N. Madson, et al. (2005). "PtdIns(4,5)P₂ functions at the cleavage furrow during cytokinesis." *Curr Biol* **15**(15): 1407-12.
- Fisher, R. P. and D. O. Morgan (1994). "A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase." *Cell* **78**(4): 713-24.
- Forester, C. M., J. Maddox, et al. (2007). "Control of mitotic exit by PP2A regulation of Cdc25C and Cdk1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(50): 19867-72.
- Fukasawa, K., T. Choi, et al. (1996). "Abnormal centrosome amplification in the absence of p53." *Science* **271**(5256): 1744-7.
- Furuya, T., T. Uchiyama, et al. (2000). "Relationship between chromosomal instability and intratumoral regional DNA ploidy heterogeneity in primary gastric cancers." *Clin Cancer Res* **6**(7): 2815-20.
- Gaetz, J. and T. M. Kapoor (2004). "Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles." *J Cell Biol* **166**(4): 465-71.
- Ganem, N. J. and D. A. Compton (2004). "The KinI kinesin Kif2a is required for bipolar spindle assembly through a functional relationship with MCAK." *J Cell Biol* **166**(4): 473-8.
- Gassmann, R., A. Carvalho, et al. (2004). "Borealin: a novel chromosomal passenger required for stability of the bipolar mitotic spindle." *J Cell Biol* **166**(2): 179-91.
- Geigl, J. B., A. C. Obenauf, et al. (2008). "Defining 'chromosomal instability'." *Trends Genet* **24**(2): 64-9.
- Genovese, C., D. Trani, et al. (2006). "Cell cycle control and beyond: emerging roles for the retinoblastoma gene family." *Oncogene* **25**(38): 5201-9.
- Gergely, F., C. Karlsson, et al. (2000). "The TACC domain identifies a family of centrosomal proteins that can interact with microtubules." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14352-7.
- Glotzer, M., A. W. Murray, et al. (1991). "Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway." *Nature* **349**(6305): 132-8.
- Goshima, G., F. Nedelec, et al. (2005). "Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins." *J Cell Biol* **171**(2): 229-40.
- Goto, H., Y. Yasui, et al. (2003). "Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process." *J Biol Chem* **278**(10): 8526-30.
- Gottlieb, E., R. Haffner, et al. (1994). "Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal." *Embo J* **13**(6): 1368-74.
- Gromley, A., A. Jurczyk, et al. (2003). "A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase." *J Cell Biol* **161**(3): 535-45.
- Groth, A., J. D. Weber, et al. (2000). "Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D-dependent kinases." *J Biol Chem* **275**(35): 27473-80.
- Gruss, O. J., R. E. Carazo-Salas, et al. (2001). "Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity." *Cell* **104**(1): 83-93.
- Ha, G. H., K. H. Baek, et al. (2007). "p53 activation in response to mitotic spindle damage requires signaling via BubR1-mediated phosphorylation." *Cancer Res* **67**(15): 7155-64.
- Haering, C. H. and K. Nasmyth (2003). "Building and breaking bridges between sister chromatids." *Bioessays* **25**(12): 1178-91.
- Hagting, A., N. Den Elzen, et al. (2002). "Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1." *J Cell Biol* **157**(7): 1125-37.
- Han, J. and P. Sun (2007). "The pathways to tumor suppression via route p38." *Trends Biochem Sci* **32**(8): 364-71.
- Harley, C. B., A. B. Futcher, et al. (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* **345**(6274): 458-60.
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." *Science* **246**(4930): 629-34.
- Hayflick, L. (1965). "The Limited In Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." *Exp Cell Res* **37**: 614-36.
- Hayflick, L. (2003). "Living forever and dying in the attempt." *Exp Gerontol* **38**(11-12): 1231-41.
- Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Hickson, G. R. and P. H. O'Farrell (2008). "Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis." *J Cell Biol* **180**(2): 285-94.

- Hinchcliffe, E. H., F. J. Miller, et al. (2001). "Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase." *Science* **291**(5508): 1547-50.
- Hirano, T. and T. J. Mitchison (1994). "A heterodimeric coiled-coil protein required for mitotic chromosome condensation in vitro." *Cell* **79**(3): 449-58.
- Hoffmann, I., P. R. Clarke, et al. (1993). "Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis." *Embo J* **12**(1): 53-63.
- Honda, R., R. Korner, et al. (2003). "Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis." *Mol Biol Cell* **14**(8): 3325-41.
- Howell, B. J., D. B. Hoffman, et al. (2000). "Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells." *J Cell Biol* **150**(6): 1233-50.
- Howell, B. J., B. F. McEwen, et al. (2001). "Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation." *J Cell Biol* **155**(7): 1159-72.
- Hoyt, M. A., L. Totis, et al. (1991). "S. cerevisiae genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function." *Cell* **66**(3): 507-17.
- Hsu, S. C., C. D. Hazuka, et al. (1999). "Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex." *Trends Cell Biol* **9**(4): 150-3.
- Huot, T. J., J. Rowe, et al. (2002). "Biallelic mutations in p16(INK4a) confer resistance to Ras- and Ets-induced senescence in human diploid fibroblasts." *Mol Cell Biol* **22**(23): 8135-43.
- Iliakis, G., Y. Wang, et al. (2003). "DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation." *Oncogene* **22**(37): 5834-47.
- Jallepalli, P. V., I. C. Waizenegger, et al. (2001). "Securin is required for chromosomal stability in human cells." *Cell* **105**(4): 445-57.
- Jaworski, J., C. C. Hoogenraad, et al. (2008). "Microtubule plus-end tracking proteins in differentiated mammalian cells." *Int J Biochem Cell Biol* **40**(4): 619-37.
- Jordan, M. A., D. Thrower, et al. (1992). "Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis." *J Cell Sci* **102 (Pt 3)**: 401-16.
- Jordan, M. A. and L. Wilson (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs." *Nat Rev Cancer* **4**(4): 253-65.
- Kang, D., J. Chen, et al. (2002). "The checkpoint protein Chfr is a ligase that ubiquitinates Plk1 and inhibits Cdc2 at the G2 to M transition." *J Cell Biol* **156**(2): 249-59.
- Kapitein, L. C., E. J. Peterman, et al. (2005). "The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks." *Nature* **435**(7038): 114-8.
- Kapoor, T. M., T. U. Mayer, et al. (2000). "Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5." *J Cell Biol* **150**(5): 975-88.
- Karess, R. (2005). "Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint." *Trends Cell Biol* **15**(7): 386-92.
- Karlseder, J., A. Smogorzewska, et al. (2002). "Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss." *Science* **295**(5564): 2446-9.
- Karlsson-Rosenthal, C. and J. B. Millar (2006). "Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery." *Trends Cell Biol* **16**(6): 285-92.
- Karsenti, E. and I. Vernos (2001). "The mitotic spindle: a self-made machine." *Science* **294**(5542): 543-7.
- Kaur, H., A. C. Stiff, et al. (2007). "Analysis of mitotic phosphorylation of borealin." *BMC Cell Biol* **8**: 5.
- Khodjakov, A. and C. L. Rieder (2001). "Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression." *J Cell Biol* **153**(1): 237-42.
- King, R. W., R. J. Deshaies, et al. (1996). "How proteolysis drives the cell cycle." *Science* **274**(5293): 1652-9.
- Kirschner, M. and T. Mitchison (1986). "Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis." *Cell* **45**(3): 329-42.
- Klein, U. R., E. A. Nigg, et al. (2006). "Centromere targeting of the chromosomal passenger complex requires a ternary subcomplex of Borealin, Survivin, and the N-terminal domain of INCENP." *Mol Biol Cell* **17**(6): 2547-58.
- Kline-Smith, S. L., A. Khodjakov, et al. (2004). "Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments." *Mol Biol Cell* **15**(3): 1146-59.
- Kline-Smith, S. L. and C. E. Walczak (2004). "Mitotic spindle assembly and chromosome segregation: refocusing on microtubule dynamics." *Mol Cell* **15**(3): 317-27.
- Knowlton, A. L., W. Lan, et al. (2006). "Aurora B is enriched at merotelic attachment sites, where it regulates MCAK." *Curr Biol* **16**(17): 1705-10.

Koffa, M. D., C. M. Casanova, et al. (2006). "HURP is part of a Ran-dependent complex involved in spindle formation." *Curr Biol* **16**(8): 743-54.

Kuang, J., J. Zhao, et al. (1989). "Mitosis-specific monoclonal antibody MPM-2 inhibits *Xenopus* oocyte maturation and depletes maturation-promoting activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(13): 4982-6.

Kukushkin, A. N., M. V. Abramova, et al. (2002). "Downregulation of c-fos gene transcription in cells transformed by E1A and cHa-ras oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at c-fos promoter." *Oncogene* **21**(5): 719-30.

Kurasawa, Y., W. C. Earnshaw, et al. (2004). "Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation." *Embo J* **23**(16): 3237-48.

Lan, W., X. Zhang, et al. (2004). "Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity." *Curr Biol* **14**(4): 273-86.

Lanzetti, L. (2007). "Actin in membrane trafficking." *Curr Opin Cell Biol* **19**(4): 453-8.

Lawrence, C. J., R. K. Dawe, et al. (2004). "A standardized kinesin nomenclature." *J Cell Biol* **167**(1): 19-22.

Lee, M. J., F. Gergely, et al. (2001). "MSPs/XMAP215 interacts with the centrosomal protein D-TACC to regulate microtubule behaviour." *Nat Cell Biol* **3**(7): 643-9.

Lee, W. L., M. A. Kaiser, et al. (2005). "The offloading model for dynein function: differential function of motor subunits." *J Cell Biol* **168**(2): 201-7.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." *Nature* **386**(6625): 623-7.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." *Nature* **396**(6712): 643-9.

Lens, S. M., G. Vader, et al. (2006). "The case for Survivin as mitotic regulator." *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 616-22.

Levesque, A. A. and D. A. Compton (2001). "The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles." *J Cell Biol* **154**(6): 1135-46.

Levesque, A. A., L. Howard, et al. (2003). "A functional relationship between NuMA and kid is involved in both spindle organization and chromosome alignment in vertebrate cells." *Mol Biol Cell* **14**(9): 3541-52.

Levine, A. J. (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." *Cell* **88**(3): 323-31.

Li, H., Y. Wang, et al. (2008). "Plk1-dependent phosphorylation regulates functions of DNA topoisomerase IIalpha in cell cycle progression." *J Biol Chem* **283**(10): 6209-21.

Li, R. and A. W. Murray (1991). "Feedback control of mitosis in budding yeast." *Cell* **66**(3): 519-31.

Lindon, C. and J. Pines (2004). "Ordered proteolysis in anaphase inactivates Plk1 to contribute to proper mitotic exit in human cells." *J Cell Biol* **164**(2): 233-41.

Lipp, J. J., T. Hirota, et al. (2007). "Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes." *J Cell Sci* **120**(Pt 7): 1245-55.

Louvet-Vallee, S. (2000). "ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling." *Biol Cell* **92**(5): 305-16.

Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg (1998). "Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes." *Mol Cell Biol* **18**(2): 753-61.

Macaluso, M., M. Montanari, et al. (2006). "Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes." *Oncogene* **25**(38): 5263-7.

Madaule, P., M. Eda, et al. (1998). "Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis." *Nature* **394**(6692): 491-4.

Makela, T. P., J. P. Tassan, et al. (1994). "A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15." *Nature* **371**(6494): 254-7.

Mallette, F. A., M. F. Gaumont-Leclerc, et al. (2007). "The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence." *Genes Dev* **21**(1): 43-8.

Mandelkow, E. and E. M. Mandelkow (1995). "Microtubules and microtubule-associated proteins." *Curr Opin Cell Biol* **7**(1): 72-81.

Manning, A. L. and D. A. Compton (2007). "Mechanisms of spindle-pole organization are influenced by kinetochore activity in mammalian cells." *Curr Biol* **17**(3): 260-5.

Manning, A. L. and D. A. Compton (2008). "Structural and regulatory roles of nonmotor spindle proteins." *Curr Opin Cell Biol* **20**(1): 101-6.

Manning, A. L., N. J. Ganem, et al. (2007). "The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells." *Mol Biol Cell* **18**(8): 2970-9.

Mantel, C., Y. Guo, et al. (2008). "Cells enter a unique intermediate 4N stage, not 4N-G1, after aborted mitosis." *Cell Cycle* **7**(4): 484-92.

Mao, Y., A. Abrieu, et al. (2003). "Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1." *Cell* **114**(1): 87-98.

Mao, Y., A. Desai, et al. (2005). "Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling." *J Cell Biol* **170**(6): 873-80.

- Margolis, R. L. and L. Wilson (1978). "Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro." *Cell* **13**(1): 1-8.
- Margolis, S. S., J. A. Perry, et al. (2006). "Role for the PP2A/B56delta phosphatase in regulating 14-3-3 release from Cdc25 to control mitosis." *Cell* **127**(4): 759-73.
- Margolis, S. S., S. Walsh, et al. (2003). "PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation." *Embo J* **22**(21): 5734-45.
- Margottin-Goguuet, F., J. Y. Hsu, et al. (2003). "Prophase destruction of Emi1 by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase." *Dev Cell* **4**(6): 813-26.
- Marklund, U., N. Larsson, et al. (1996). "Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics." *Embo J* **15**(19): 5290-8.
- Matsumura, F., G. Totsukawa, et al. (2001). "Role of myosin light chain phosphorylation in the regulation of cytokinesis." *Cell Struct Funct* **26**(6): 639-44.
- Matsusaka, T. and J. Pines (2004). "Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells." *J Cell Biol* **166**(4): 507-16.
- Mayr, M. I., S. Hummer, et al. (2007). "The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression." *Curr Biol* **17**(6): 488-98.
- Mazumdar, M. and T. Misteli (2005). "Chromokinesins: multitalented players in mitosis." *Trends Cell Biol* **15**(7): 349-55.
- Mazumdar, M., S. Sundareshan, et al. (2004). "Human chromokinesin KIF4A functions in chromosome condensation and segregation." *J Cell Biol* **166**(5): 613-20.
- McCullum, D. (2004). "Cytokinesis: the central spindle takes center stage." *Curr Biol* **14**(22): R953-5.
- McConnell, B. B., F. J. Gregory, et al. (1999). "Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes." *Mol Cell Biol* **19**(3): 1981-9.
- McNally, F. J. (1996). "Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle." *Curr Opin Cell Biol* **8**(1): 23-9.
- McNally, F. J., K. Okawa, et al. (1996). "Katanin, the microtubule-severing ATPase, is concentrated at centrosomes." *J Cell Sci* **109 (Pt 3)**: 561-7.
- Merdes, A., R. Heald, et al. (2000). "Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA." *J Cell Biol* **149**(4): 851-62.
- Merdes, A., K. Ramyar, et al. (1996). "A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly." *Cell* **87**(3): 447-58.
- Midgley, C. A., J. M. Desterro, et al. (2000). "An N-terminal p14ARF peptide blocks Mdm2-dependent ubiquitination in vitro and can activate p53 in vivo." *Oncogene* **19**(19): 2312-23.
- Mikhailov, A. and C. L. Rieder (2002). "Cell cycle: stressed out of mitosis." *Curr Biol* **12**(9): R331-3.
- Mikhailov, A., M. Shinohara, et al. (2004). "Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G2/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway." *J Cell Biol* **166**(4): 517-26.
- Mikhailov, A., M. Shinohara, et al. (2005). "The p38-mediated stress-activated checkpoint. A rapid response system for delaying progression through antephasis and entry into mitosis." *Cell Cycle* **4**(1): 57-62.
- Mikule, K., B. Delaval, et al. (2007). "Loss of centrosome integrity induces p38-p53-p21-dependent G1-S arrest." *Nat Cell Biol* **9**(2): 160-70.
- Minoshima, Y., T. Kawashima, et al. (2003). "Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis." *Dev Cell* **4**(4): 549-60.
- Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* **312**(5991): 237-42.
- Miyamoto, D. T., Z. E. Perlman, et al. (2004). "The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in *Xenopus laevis* egg extract spindles." *J Cell Biol* **167**(5): 813-8.
- Mogilner, A., R. Wollman, et al. (2006). "Modeling mitosis." *Trends Cell Biol* **16**(2): 88-96.
- Montagnoli, A., F. Fiore, et al. (1999). "Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation." *Genes Dev* **13**(9): 1181-9.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-91.
- Morrow, C. J., A. Tighe, et al. (2005). "Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20." *J Cell Sci* **118**(Pt 16): 3639-52.
- Mueller, P. R., T. R. Coleman, et al. (1995). "Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15." *Science* **270**(5233): 86-90.
- Murphy, S. M. and T. Stearns (1996). "Cytoskeleton: microtubule nucleation takes shape." *Curr Biol* **6**(6): 642-4.
- Murray, A. (1995). "Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis." *Cell* **81**(2): 149-52.

- Murray, A. W. (1998). "How to compact DNA." *Science* **282**(5388): 425, 427.
- Musacchio, A. and E. D. Salmon (2007). "The spindle-assembly checkpoint in space and time." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(5): 379-93.
- Mussman, J. G., H. F. Horn, et al. (2000). "Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression." *Oncogene* **19**(13): 1635-46.
- Nicklas, R. B., S. C. Ward, et al. (1995). "Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint." *J Cell Biol* **130**(4): 929-39.
- Niclas, J., V. J. Allan, et al. (1996). "Cell cycle regulation of dynein association with membranes modulates microtubule-based organelle transport." *J Cell Biol* **133**(3): 585-93.
- Nigg, E. A. (1992). "Assembly-disassembly of the nuclear lamina." *Curr Opin Cell Biol* **4**(1): 105-9.
- Nurse, P. (1990). "Universal control mechanism regulating onset of M-phase." *Nature* **344**(6266): 503-8.
- O'Connell, C. B. and A. L. Khodjakov (2007). "Cooperative mechanisms of mitotic spindle formation." *J Cell Sci* **120**(Pt 10): 1717-22.
- Obaya, A. J., M. K. Mateyak, et al. (1999). "Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle." *Oncogene* **18**(19): 2934-41.
- Ohsugi, M., K. Adachi, et al. (2008). "Kid-mediated chromosome compaction ensures proper nuclear envelope formation." *Cell* **132**(5): 771-82.
- Ohtani, N., Z. Zebedee, et al. (2001). "Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence." *Nature* **409**(6823): 1067-70.
- Olmsted, J. B. (1986). "Microtubule-associated proteins." *Annu Rev Cell Biol* **2**: 421-57.
- Parker, L. L. and H. Piwnicka-Worms (1992). "Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase." *Science* **257**(5078): 1955-7.
- Peng, C. Y., P. R. Graves, et al. (1997). "Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216." *Science* **277**(5331): 1501-5.
- Petronczki, M., M. Glotzer, et al. (2007). "Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle." *Dev Cell* **12**(5): 713-25.
- Piekny, A., M. Werner, et al. (2005). "Cytokinesis: welcome to the Rho zone." *Trends Cell Biol* **15**(12): 651-8.
- Piekny, A. J. and M. Glotzer (2008). "Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis." *Curr Biol* **18**(1): 30-6.
- Piel, M., J. Nordberg, et al. (2001). "Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells." *Science* **291**(5508): 1550-3.
- Pines, J. (1992). "Cell proliferation and control." *Curr Opin Cell Biol* **4**(2): 144-8.
- Pines, J. (2006). "Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time." *Trends Cell Biol* **16**(1): 55-63.
- Planas-Silva, M. D. and R. A. Weinberg (1997). "The restriction point and control of cell proliferation." *Curr Opin Cell Biol* **9**(6): 768-72.
- Prekeris, R. and G. W. Gould (2008). "Breaking up is hard to do - membrane traffic in cytokinesis." *J Cell Sci* **121**(Pt 10): 1569-76.
- Raynaud-Messina, B. and A. Merdes (2007). "Gamma-tubulin complexes and microtubule organization." *Curr Opin Cell Biol* **19**(1): 24-30.
- Reimann, J. D., E. Freed, et al. (2001). "Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex." *Cell* **105**(5): 645-55.
- Reimann, J. D., B. E. Gardner, et al. (2001). "Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins." *Genes Dev* **15**(24): 3278-85.
- Ren, B., H. Cam, et al. (2002). "E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints." *Genes Dev* **16**(2): 245-56.
- Ribbeck, K., A. C. Groen, et al. (2006). "NuSAP, a mitotic RanGTP target that stabilizes and cross-links microtubules." *Mol Biol Cell* **17**(6): 2646-60.
- Ribbeck, K., T. Raemaekers, et al. (2007). "A role for NuSAP in linking microtubules to mitotic chromosomes." *Curr Biol* **17**(3): 230-6.
- Rieder, C. L., R. W. Cole, et al. (1995). "The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores." *J Cell Biol* **130**(4): 941-8.
- Rieder, C. L. and H. Maiato (2004). "Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint." *Dev Cell* **7**(5): 637-51.
- Rieder, C. L., A. Schultz, et al. (1994). "Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle." *J Cell Biol* **127**(5): 1301-10.

- Roninson, I. B. (2003). "Tumor cell senescence in cancer treatment." *Cancer Res* **63**(11): 2705-15.
- Roninson, I. B., E. V. Broude, et al. (2001). "If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells." *Drug Resist Updat* **4**(5): 303-13.
- Ruchaud, S., M. Carmena, et al. (2007). "Chromosomal passengers: conducting cell division." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(10): 798-812.
- Russell, P. and P. Nurse (1987). "Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog." *Cell* **49**(4): 559-67.
- Saeki, A., S. Tamura, et al. (2002). "Frequent impairment of the spindle assembly checkpoint in hepatocellular carcinoma." *Cancer* **94**(7): 2047-54.
- Sandhu, C., J. Garbe, et al. (1997). "Transforming growth factor beta stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells." *Mol Cell Biol* **17**(5): 2458-67.
- Santamaria, P. G. and M. Pagano (2007). "The pRb-Cdh1-p27 autoamplifying network." *Nat Cell Biol* **9**(2): 137-8.
- Sato, N., K. Mizumoto, et al. (2000). "A possible role for centrosome overduplication in radiation-induced cell death." *Oncogene* **19**(46): 5281-90.
- Schmidt, A. and M. N. Hall (1998). "Signaling to the actin cytoskeleton." *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 305-38.
- Scolnick, D. M. and T. D. Halazonetis (2000). "Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase." *Nature* **406**(6794): 430-5.
- Serrano, M., A. W. Lin, et al. (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* **88**(5): 593-602.
- Sheaff, R. J., M. Groudine, et al. (1997). "Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1." *Genes Dev* **11**(11): 1464-78.
- Sherr, C. J. (1995). "D-type cyclins." *Trends Biochem Sci* **20**(5): 187-90.
- Sillje, H. H., S. Nagel, et al. (2006). "HURP is a Ran-importin beta-regulated protein that stabilizes kinetochore microtubules in the vicinity of chromosomes." *Curr Biol* **16**(8): 731-42.
- Skoufias, D. A., P. R. Andreassen, et al. (2001). "Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(8): 4492-7.
- Skoufias, D. A., F. B. Lacroix, et al. (2004). "Inhibition of DNA decatenation, but not DNA damage, arrests cells at metaphase." *Mol Cell* **15**(6): 977-90.
- Slattery, S. D., R. V. Moore, et al. (2008). "Aurora-C and Aurora-B share phosphorylation and regulation of cenp-A and borealin during mitosis." *Cell Cycle* **7**(6).
- Sotillo, R., E. Hernando, et al. (2007). "Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice." *Cancer Cell* **11**(1): 9-23.
- Spiegelman, B. M., S. M. Penningroth, et al. (1977). "Turnover of tubulin and the N site GTP in Chinese hamster ovary cells." *Cell* **12**(3): 587-600.
- Srsen, V., N. Gnad, et al. (2006). "Inhibition of centrosome protein assembly leads to p53-dependent exit from the cell cycle." *J Cell Biol* **174**(5): 625-30.
- Srsen, V. and A. Merdes (2006). "The centrosome and cell proliferation." *Cell Div* **1**: 26.
- Stanford, J. S. and J. V. Ruderman (2005). "Changes in regulatory phosphorylation of Cdc25C Ser287 and Wee1 Ser549 during normal cell cycle progression and checkpoint arrests." *Mol Biol Cell* **16**(12): 5749-60.
- Stehman, S. A., Y. Chen, et al. (2007). "NudE and NudEL are required for mitotic progression and are involved in dynein recruitment to kinetochores." *J Cell Biol* **178**(4): 583-94.
- Stossel, T. P., C. Chaponnier, et al. (1985). "Nonmuscle actin-binding proteins." *Annu Rev Cell Biol* **1**: 353-402.
- Strick, R. and U. K. Laemmli (1995). "SARs are cis DNA elements of chromosome dynamics: synthesis of a SAR repressor protein." *Cell* **83**(7): 1137-48.
- Sudakin, V., G. K. Chan, et al. (2001). "Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2." *J Cell Biol* **154**(5): 925-36.
- Sun, H. Q., K. Kwiatkowska, et al. (1995). "Actin monomer binding proteins." *Curr Opin Cell Biol* **7**(1): 102-10.
- Tai, C. Y., D. L. Dujardin, et al. (2002). "Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function." *J Cell Biol* **156**(6): 959-68.
- Takenaka, K., T. Moriguchi, et al. (1998). "Activation of the protein kinase p38 in the spindle assembly checkpoint and mitotic arrest." *Science* **280**(5363): 599-602.
- Tanaka, T. U., M. J. Stark, et al. (2005). "Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(12): 929-42.
- Taylor, S. S. and F. McKeon (1997). "Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage." *Cell* **89**(5): 727-35.
- Taylor, W. R. and G. R. Stark (2001). "Regulation of the G2/M transition by p53." *Oncogene* **20**(15): 1803-15.

- TerBush, D. R. and P. Novick (1995). "Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Cell Biol* **130**(2): 299-312.
- Thompson, S. L. and D. A. Compton (2008). "Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells." *J Cell Biol* **180**(4): 665-72.
- Tighe, A., V. L. Johnson, et al. (2001). "Aneuploid colon cancer cells have a robust spindle checkpoint." *EMBO Rep* **2**(7): 609-14.
- Torres, E. M., T. Sokolsky, et al. (2007). "Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast." *Science* **317**(5840): 916-24.
- Toyoda, Y. and M. Yanagida (2006). "Coordinated requirements of human topo II and cohesin for metaphase centromere alignment under Mad2-dependent spindle checkpoint surveillance." *Mol Biol Cell* **17**(5): 2287-302.
- Trimarchi, J. M. and J. A. Lees (2002). "Sibling rivalry in the E2F family." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(1): 11-20.
- Tsang, W. Y., A. Spektor, et al. (2006). "CP110 cooperates with two calcium-binding proteins to regulate cytokinesis and genome stability." *Mol Biol Cell* **17**(8): 3423-34.
- Tsou, M. F. and T. Stearns (2006). "Controlling centrosome number: licenses and blocks." *Curr Opin Cell Biol* **18**(1): 74-8.
- Tsou, M. F. and T. Stearns (2006). "Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle." *Nature* **442**(7105): 947-51.
- Tsvetkov, L. and D. F. Stern (2005). "Phosphorylation of Plk1 at S137 and T210 is inhibited in response to DNA damage." *Cell Cycle* **4**(1): 166-71.
- Uetake, Y., J. Loncarek, et al. (2007). "Cell cycle progression and de novo centriole assembly after centrosomal removal in untransformed human cells." *J Cell Biol* **176**(2): 173-82.
- Uhlmann, F. (2003). "Chromosome cohesion and separation: from men and molecules." *Curr Biol* **13**(3): R104-14.
- Vader, G., J. J. Kauw, et al. (2006). "Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody." *EMBO Rep* **7**(1): 85-92.
- Vagnarelli, P., D. F. Hudson, et al. (2006). "Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis." *Nat Cell Biol* **8**(10): 1133-42.
- Vaisberg, E. A., M. P. Koonce, et al. (1993). "Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation." *J Cell Biol* **123**(4): 849-58.
- Vandekerckhove, J. and K. Weber (1978). "At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide." *J Mol Biol* **126**(4): 783-802.
- Vicente-Manzanares, M., D. J. Webb, et al. (2005). "Cell migration at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 21): 4917-9.
- Vogel, C., A. Kienitz, et al. (2004). "Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy." *Oncogene* **23**(41): 6845-53.
- Wang, Y., J. Toppari, et al. (2006). "Inhibition of Aurora kinases perturbs chromosome alignment and spindle checkpoint signaling in rat spermatocytes." *Exp Cell Res* **312**(18): 3459-70.
- Wang, Y. L. (1985). "Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling." *J Cell Biol* **101**(2): 597-602.
- Wang, Y. L. (2001). "The mechanism of cytokinesis: reconsideration and reconciliation." *Cell Struct Funct* **26**(6): 633-8.
- Wang, Z., J. M. Cummins, et al. (2004). "Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability." *Cancer Res* **64**(9): 2998-3001.
- Warner, B. J., S. W. Blain, et al. (1999). "Myc downregulation by transforming growth factor beta required for activation of the p15(Ink4b) G(1) arrest pathway." *Mol Cell Biol* **19**(9): 5913-22.
- Waters, J. C., R. H. Chen, et al. (1998). "Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension." *J Cell Biol* **141**(5): 1181-91.
- Weaver, B. A., Z. Q. Bonday, et al. (2003). "Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss." *J Cell Biol* **162**(4): 551-63.
- Weaver, B. A., A. D. Silk, et al. (2007). "Aneuploidy acts both oncogenically and as a tumor suppressor." *Cancer Cell* **11**(1): 25-36.
- Welch, M. D. (1999). "The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex." *Trends Cell Biol* **9**(11): 423-7.
- Welch, M. D., A. Mallavarapu, et al. (1997). "Actin dynamics in vivo." *Curr Opin Cell Biol* **9**(1): 54-61.
- Wendell, K. L., L. Wilson, et al. (1993). "Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes." *J Cell Sci* **104** (Pt 2): 261-74.

- Wheatley, S. P., A. J. Henzing, et al. (2004). "Aurora-B phosphorylation in vitro identifies a residue of survivin that is essential for its localization and binding to inner centromere protein (INCENP) in vivo." *J Biol Chem* **279**(7): 5655-60.
- Wittmann, T., A. Hyman, et al. (2001). "The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors." *Nat Cell Biol* **3**(1): E28-34.
- Wolfe, B. A. and K. L. Gould (2004). "Inactivating Cdc25, mitotic style." *Cell Cycle* **3**(5): 601-3.
- Wong, C. and T. Stearns (2003). "Centrosome number is controlled by a centrosome-intrinsic block to reduplication." *Nat Cell Biol* **5**(6): 539-44.
- Wood, K. W., R. Sakowicz, et al. (1997). "CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment." *Cell* **91**(3): 357-66.
- Wright, W. E. and J. W. Shay (2001). "Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting." *Curr Opin Genet Dev* **11**(1): 98-103.
- Wu, R. C. and A. H. Schonthal (1997). "Activation of p53-p21waf1 pathway in response to disruption of cell-matrix interactions." *J Biol Chem* **272**(46): 29091-8.
- Xie, S., H. Wu, et al. (2001). "Plk3 functionally links DNA damage to cell cycle arrest and apoptosis at least in part via the p53 pathway." *J Biol Chem* **276**(46): 43305-12.
- Yamashiro, S., G. Totsukawa, et al. (2003). "Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces di-phosphorylation of regulatory light chain of myosin II." *Mol Biol Cell* **14**(5): 1745-56.
- Yan, X., F. Li, et al. (2003). "Human Nudel and NudE as regulators of cytoplasmic dynein in poleward protein transport along the mitotic spindle." *Mol Cell Biol* **23**(4): 1239-50.
- Yen, T. J., G. Li, et al. (1992). "CENP-E is a putative kinetochore motor that accumulates just before mitosis." *Nature* **359**(6395): 536-9.
- Yong-Gonzalez, V., B. D. Wang, et al. (2007). "Condensin function at centromere chromatin facilitates proper kinetochore tension and ensures correct mitotic segregation of sister chromatids." *Genes Cells* **12**(9): 1075-90.
- Yu, H. (2006). "Structural activation of Mad2 in the mitotic spindle checkpoint: the two-state Mad2 model versus the Mad2 template model." *J Cell Biol* **173**(2): 153-7.
- Yu, H. (2007). "Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine." *Mol Cell* **27**(1): 3-16.
- Zheng, W., H. Wang, et al. (2004). "Regulation of cellular senescence and p16(INK4a) expression by Id1 and E47 proteins in human diploid fibroblast." *J Biol Chem* **279**(30): 31524-32.
- Zhu, C., E. Bossy-Wetzels, et al. (2005). "Recruitment of MKLP1 to the spindle midzone/midbody by INCENP is essential for midbody formation and completion of cytokinesis in human cells." *Biochem J* **389**(Pt 2): 373-81.
- Zhu, J., D. Woods, et al. (1998). "Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf." *Genes Dev* **12**(19): 2997-3007.