



**HAL**  
open science

## Quelle fonction pour la CLIP-170 ? Recherche de partenaires et nouveaux outils d'investigation.

Fabrice Cordelières

### ► To cite this version:

Fabrice Cordelières. Quelle fonction pour la CLIP-170 ? Recherche de partenaires et nouveaux outils d'investigation.. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2003. Français. NNT: . tel-00432222

**HAL Id: tel-00432222**

**<https://theses.hal.science/tel-00432222v1>**

Submitted on 14 Nov 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.



N° D'ORDRE :



**UNIVERSITE PARIS XI  
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY**

**THESE**

**Présentée**

**Pour obtenir**

**Le GRADE de DOCTEUR EN SCIENCES  
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY**

**PAR**

**Fabrice Cordelières**

**Sujet : Quelle fonction pour la CLIP-170 ?  
Recherche de partenaires et nouveaux outils d'investigation.**

**Soutenue le jeudi 24 avril 2003 devant la commission d'examen**

<b>Pr. Michel Jacquet</b>	<b>(Président)</b>
<b>Dr. Damian Brunner</b>	<b>(Rapporteur)</b>
<b>Pr. Philippe Denoulet</b>	<b>(Rapporteur)</b>
<b>Dr. Brigitte Buendia</b>	<b>(Examineur)</b>
<b>Dr. Franck Perez</b>	<b>(Examineur)</b>
<b>Pr. Jan De Mey</b>	<b>(Directeur de thèse)</b>



*A mon petit grand frère*

*A mes parents*





## Remerciements :

Enfin nous y voilà : le point final est mis, il ne reste plus qu'à remercier... Mais au fait, comment tout cela a commencé ? Ah oui... Une chamaillerie d'amphi, il me semble. Ou plutôt un gros soupir, pendant un cours de licence. Soupir suivi d'un surprenant "monsieur, passez au tableau, nous allons voir si vous avez un cerveau ". Eh oui, ce vigoureux échange avec le Pr Jan De Mey a sonné mon entrée en biologie cellulaire ! Le temps de revenir à ma place avec un "demi-cerveau" gracieusement accordé et me voici reparti pour un petit tour au Royaume-Uni, à Manchester. Là, je rencontre le complexe dynéine/dynactine chez le Dr Viki Allan, présenté par Christian Roghi et Steven Addinall. Je reviens finalement en France pour le DEA Biologie Moléculaire de la Cellule.

Si je remercie Jan de m'avoir aménagé un espace de liberté et d'indépendance au sein de son laboratoire, je n'en oublie pas pour autant Viki, Christian et Steven de m'avoir mis le pied à l'étrier. Le travail présenté dans cette thèse est principalement le fruit d'une collaboration franco-israélienne, aussi je remercie le Dr Orly Reiner de son implication dans le projet CLIP-170/LIS1. Côté français, je suis reconnaissant à Frédérique Coquelle et Jim Dompierre avec lesquels j'ai partagé les "joies" de ces quelques années de thèse : une expérience inoubliable qui crée des liens !!!

Je remercie Le Pr Michel Jacquet de m'avoir permis de participer à l'aventure BMC et d'avoir accepté d'être président de ce jury de thèse. Je remercie l'ensemble des membres du jury, le Pr Philippe Denoulet et le Dr Damian Brunner d'avoir accepté de rédiger le rapport de thèse, ainsi que le Dr Brigitte Buendia et le Dr Franck Perez d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont appuyé et conseillé au cours de cette thèse, et principalement le Dr Simon Saule : merci d'avoir relu et commenté ce troisième tome des chroniques CLIPesques. Les Dr Jacques Ghysdael et Giuseppe Baldacci. sont remerciés pour leur soutien constant, en particulier en cette fin de thèse et son prolongement...

Les défis technologiques attenants à cette thèse ont été à l'origine de collaborations fructueuses. Aussi, je remercie le Dr Jean-Baptiste Sibarita et le Dr Jean Salamero pour leur

aide quant au retraitement et à l'analyse des images générées notamment par les expériences de microscopie 3D/vidéomicroscopie et celles de FRAP. Je suis reconnaissant à Lucien Cabanié de son aide avec la purification d'anticorps. Les Dr Frédéric Saudou, Sandrine Humbert et Simon Saule sont remerciés de m'avoir fait confiance et fait participé à leurs investigations.

L'ensemble des utilisateurs des systèmes de microscopie est remercié pour leurs sollicitations quotidiennes, leurs questions incessantes, et les défis de tous les instants ! Aux premières loges, Laurent Gautier et Raffaella Zaccarini, suivis de près par Bénédicte Charrin et Georges Renault. Je remercie dans leur ensemble les labos Saule et Saudou pour leur soutien quotidien, et Frédérique Berger pour son aide.

Je garde la mention spéciale pour les adeptes de la "cuisine expérimentale", les amateurs (ou non) du gâteau au chocolat et potirons. Un énorme merci à Christophe et Sophy, ainsi qu'à Jim et Andy pour tous les moments de bonheur partagés et ceux à venir...

Une page se tourne, une nouvelle reste à écrire : Jan, il ne me reste plus qu'à te demander cette seconde moitié de cerveau promise en licence, et dont je m'engage à faire bon usage !!!



## Résumé :

Le terme de CLIP-170 désigne la protéine de lien cytoplasmique de 170 KDa, isolée par Rickard et Kreis (1990). *In vitro*, elle constitue un lien statique entre les endosomes et les microtubules (MTs). En chacun des points où la CLIP-170 est localisée, elle se co-distribue avec le complexe moteur dynéine/dynactine (D/D). Les auteurs ont initialement établi un modèle de fonctionnement de concert de ces trois protagonistes : la CLIP-170 établirait le lien initial entre le cargo et le MT. Le complexe D/D serait recruté sur le cargo. Une fois le moteur associé au MT, le lien statique serait levé, rendant possible le mouvement.

Ce modèle offrait une explication aux données d'immunolocalisation. Toutefois, le fonctionnement de concert de la CLIP-170 et du moteur moléculaire nécessitait que l'on puisse trouver une interaction entre les protagonistes. Les travaux présentés dans cette thèse apportent pour la première fois la preuve d'une interaction indirecte entre le complexe D/D et la CLIP-170. LIS1 est une protéine codée par le gène causal du syndrome de Miller-Dieker, une forme de lissencéphalie de type I. Elle sert d'adaptateur entre le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 et le complexe moteur dont elle régule l'activité.

Nos résultats établissent que le domaine d'interaction de la CLIP-170 avec LIS1 est requis pour l'adressage de la première aux kinétochores prémétaphasiques. Il est nécessaire à l'adressage de LIS1 (et du complexe moteur) aux bouts (+) des MTs interphasiques.

Nous présentons deux nouvelles approches permettant d'interférer avec le fonctionnement de la CLIP-170 tant en interphase qu'en mitose : la microinjection d'anticorps dirigés contre les domaines extrêmes de la protéine, ainsi que l'utilisation de siRNA dirigés contre l'ARNm la codant. Combinées aux techniques de suivi de protéines fluorescentes par vidéomicroscopie 3D développées au laboratoire, elles permettront d'interférer avec le fonctionnement de la CLIP-170 et de définir ainsi son rôle.

**Mots-clés :** CLIP-170, complexe dynéine/dynactine, LIS1, microtubule, kinétochore, +TIPs.

## Abstract :

CLIP-170 links endosomes and microtubules (MTs) *in vitro*. It also treadmills at the +ends of MTs and associates with kinetochores and MT cortical anchors. Its behaviour at MT +ends is that of a +TIPs, of which EB1 is a member. +TIPs recruit molecular complexes at MT +ends to regulate MT dynamics and to mediate cargo loading or interactions with cortical cues.

Here we demonstrate interaction between CLIP-170 and LIS1 *via* its distal zinc fingers. Our results indicate that LIS1 recruitment to kinetochores is dynein/dynactin dependent, and that recruitment there of CLIP-170 is dependent on its binding site to LIS1. Overexpression of CLIP-170 results in a zinc finger dependent localization of phospho-LIS1 and dynactin to MT bundles, raising the possibility that the latter is targeted *via* phospho-LIS1 and dynein. This work suggests that LIS1 is a regulated adaptor between CLIP-170 and cytoplasmic dynein at sites involved in cargo-MT loading, and/or in control of MT dynamics.

We are using expression of siRNA and microinjection of region specific CLIP-170 antibodies, to investigate its functions. A Ct-pAb or a Nt-pAb displaced it from both MT plus ends in interphase and KTs in mitosis. With both pAb, EB1 remained localised to MT +ends while p150<sup>Glued</sup> was released into the cytoplasm. In addition, p150<sup>Glued</sup> was still localised at unattached KTs. Same results were obtained when CLIP-170 expression level was dramatically diminished by siRNA expression. CLIP-170 antibody microinjection did not dramatically affect mitosis, as determined on fixed cells. These preliminary findings support our model that D/D is addressed to the +TIPs through its interaction with CLIP-170 *via* LIS1. We are now evaluating by nC 3D videomicroscopy the effects of siRNA expression and microinjection on the interphase MT dynamics and on the poleward sliding of KTs to the mitotic spindle.

**Keywords :** CLIP-170, dynein/dynactin complex, LIS1, microtubule, kinetochore, +TIPs.



# Table des matières

<i>Table des matières</i> .....	<b>1</b>
<i>Abréviations</i> .....	<b>3</b>
<i>Avant-propos</i> .....	<b>6</b>
<i>Introduction</i> .....	<b>8</b>
<b>I. Les familles de CLIPs</b> .....	<b>8</b>
<b>A. Le prototype des CLIPs : la CLIP-170</b> :.....	<b>8</b>
<b>La CLIP-170 existe sous plusieurs formes résultant d'un épissage alternatif</b> :.....	<b>8</b>
1. La CLIP-170 :.....	8
a) La CLIP-170 lie les MTs via deux motifs de type CAP-Gly :.....	8
b) La CLIP-170 est un dimère :.....	10
c) La CLIP-170 lie les cargos via deux motifs de type doigt de zinc :.....	10
2. La restin :.....	12
3. D'autres produits de l'épissage alternatif ?.....	14
<b>Les trois orthologues connus de la CLIP-170 humaine</b> :.....	<b>15</b>
4. La D-CLIP-190 :.....	15
5. BIK1 :.....	15
6. Tip1p :.....	16
<b>B. CLIPs liant un cargo aux microtubules</b> :.....	<b>18</b>
1. La CLIP-115, un paralogue de la CLIP-170 :.....	18
2. Deux membres potentiels de cette famille :.....	21
a) La CLIPR-59 :.....	21
b) La PoCLIP :.....	22
<b>C. Protéines à domaine CLIP-170</b> :.....	<b>23</b>
<b>II. Quelle(s) fonction(s) pour la CLIP-170 en interphase ?</b> .....	<b>25</b>
<b>A. Le réseau microtubulaire</b> :.....	<b>25</b>
1. Les microtubules sont des hétéro-polymères : leur structure :.....	25
2. Les microtubules sont des structures dynamiques :.....	28
a) La dynamique des microtubules in vitro :.....	28
(1) L'instabilité dynamique :.....	28
(2) Le mécanisme de "treadmilling" :.....	29
(3) La coiffe GTP et la coiffe structurale :.....	30
b) La dynamique des microtubules in vivo : un exemple de l'implication des MAPs :.....	32
<b>B. La CLIP-170 est une MAP particulière</b> :.....	<b>34</b>
1. La CLIP-170 s'associe aux microtubules polymérisant :.....	34
2. La CLIP-170, prototype de la famille des +TIPs :.....	36
a) Le couple EB1/APC :.....	38
b) Le couple dynéine/dynactine :.....	41
c) Le couple CLIP-170 & -115/CLASPs :.....	43
d) +TIPs : pour quoi faire ? Quels liens entre +TIPs ?.....	44
(1) Orientation du fuseau de division chez <i>S. cerevisiae</i> :.....	45
Mécanisme d'orientation 'précoce', positionnement du noyau :.....	45
Mécanisme d'orientation 'tardif', orientation du fuseau de division :.....	47
(2) Acquisition et maintien d'une polarité cellulaire :.....	49
Asymétrie structurale et petites protéines G :.....	50
Réorientation du MTOC :.....	51
Stabilisation des microtubules vers le lamellipode :.....	52
+TIPs et transduction du signal :.....	53
<b>C. CLIP-170 : un rôle dans le trafic intracellulaire ?</b> .....	<b>55</b>
1. Modèle fonctionnel :.....	56
2. Le complexe moteur dynéine/dynactine :.....	58
a) Le complexe moteur dynéine :.....	59
(1) Les chaînes lourdes :.....	60
(2) Les chaînes intermédiaires :.....	61
Les chaînes intermédiaires :.....	61
Les chaînes légères intermédiaires :.....	62
(3) Les chaînes légères :.....	63
b) Le complexe dynactine :.....	64
(1) Le filament de 37 nm :.....	65
(2) Le bras latéral de 24 nm :.....	67
(3) Autres membres du complexe dynactine :.....	69
<b>D. Quelles fonctions pour la CLIP-170 en interphase ?</b> .....	<b>70</b>
<b>III. Quelle(s) fonction(s) pour la CLIP-170 en mitose ?</b> .....	<b>72</b>
<b>A. Assemblage du fuseau de division</b> :.....	<b>73</b>
1. Transition G2/M et changement de dynamique des MTs :.....	73
2. Microtubules et rupture de l'enveloppe nucléaire :.....	74
3. L'"effet chromatine" :.....	74
4. Moteurs moléculaires et focalisation des microtubules :.....	75
5. Le fuseau de division est constitué de trois types de MTs :.....	77
<b>B. Mouvement des chromosomes en mitose</b> :.....	<b>78</b>



1. Structure du couple centromère/kinétochore :	78
a) Le couple centromère/kinétochore chez <i>S. Cerevisiae</i> :	78
b) Le couple centromère/kinétochore chez l'homme :	79
(1) Structure du centromère :	79
(2) Structure du kinétochore :	81
Morphologie du kinétochore :	81
Constituants structuraux :	81
Le kinétochore, siège du contrôle de la transition métaphase/anaphase :	82
Le kinétochore, siège d'interactions chromosomes/microtubules :	83
2. Le mouvement des chromosomes :	84
a) Interaction initiale tangentielle et mouvement rapide :	84
b) Forces d'éjection polaire et congression :	85
c) Maintenir la bi-orientation pendant la congression :	86
<b>C. Quelle fonction pour les +TIPs en mitose ?</b>	<b>87</b>
1. Le couple dynéine/dynactine :	87
2. Le couple EBI/APC :	88
3. La CLIP-170 :	89
<b>Résultats</b>	<b>92</b>
<b>I. Avant-propos :</b>	<b>92</b>
<b>A. CLIP-170 et complexe D/D colocalisent partiellement :</b>	<b>92</b>
<b>B. A la recherche d'un lien CLIP-170 / complexe D/D :</b>	<b>93</b>
<b>C. LIS1, un bon candidat :</b>	<b>94</b>
1. NudF se comporte comme une +TIP :	94
2. LIS1, l'orthologue humain :	95
3. Les liens entre LIS1 et le complexe dynéine/dynactine :	97
<b>II. LIS1 : CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway (Coquelle et al., 2002) et résultats complémentaires :</b>	<b>99</b>
<b>A. Résultats :</b>	<b>99</b>
1. Co-distribution de LIS1 et CLIP-170 :	99
2. LIS1 et la CLIP-170 interagissent directement :	99
3. L'adressage de LIS1 aux kinétochores dépend du complexe dynéine/dynactine :	100
4. L'adressage de la CLIP-170 aux KT's dépend de son domaine de liaison à LIS1 :	100
5. Dynamique d'association de la CLIP-170 et de LIS1 aux KT's :	102
6. La CLIP-170 ne semble pas requise à la complétion de la mitose :	103
7. L'adressage de LIS1 aux bouts (+) des MT's dépend de la CLIP-170 :	103
8. Probable régulation par phosphorylation de l'interaction entre LIS1 et la CLIP-170 :	105
<b>B. Matériels et méthodes :</b>	<b>106</b>
Synchronisation de cellules :	106
Microinjection d'anticorps :	106
Constructions :	106
Expériences de FRAP :	107
<b>Discussion et perspectives</b>	<b>111</b>
<b>I. LIS1 lie la CLIP-170 au complexe dynéine/dynactine :</b>	<b>111</b>
<b>A. Interaction CLIP-170/LIS1 :</b>	<b>111</b>
<b>B. Conséquences sur la hiérarchie de recrutement :</b>	<b>111</b>
<b>II. Quelle fonction pour la CLIP-170 en interphase ?</b>	<b>113</b>
<b>A. Influencer la dynamique des microtubules en interphase :</b>	<b>113</b>
<b>B. CLIP-170 et trafic intracellulaire :</b>	<b>114</b>
<b>C. Interactions microtubules/cortex en interphase :</b>	<b>115</b>
<b>III. Quelle fonction pour la CLIP-170 en mitose ?</b>	<b>116</b>
<b>A. Interactions microtubules/cortex en mitose :</b>	<b>116</b>
<b>B. Fonction aux kinétochores :</b>	<b>117</b>
1. Hiérarchie de recrutement aux kinétochores :	117
2. Quelle fonction aux kinétochores ?	118
<b>Annexe</b>	<b>121</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>123</b>

## Abréviations

aa : Résidu acide aminé	HIV-1 : Human immunodeficiency virus, type 1
AAA : ATPase associated diverse cellular activities	IFAP : Intermediate filament associated protein
ADN : Acide désoxyribonucléique	IFT : Intraflagellar transport
ADNc : ADN complémentaire	KAR9 : Karyogamy gene 9
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique	KDa : Kilodalton
AP : Away from the pôle	KO : Knock out
APC : Adenomatous polyposis coli	KT : Kinétochore
APC/C : Anaphase promoting complex/cyclosome	LIS1 : Lissencephaly 1
ARN : Acide ribonucléique	LPA : Acide lysophosphatidique
ARNm : ARN messager	Mad : Mitotic arrest defective
Arp : Actin-related protein	MAP : Microtubule associated protein
ATP : Adénosine triphosphate	MAST : Multiple asters
BIK1 : Bilateral karyogamy defect 1	MCAK : Mitotic-centromere-associated kinesin
BIM1 : Binding to microtubules 1	MDa : Méga Dalton
Bud : Budding uninhibited by benomyl	MFA : Microfilament d'actine
CAP-Gly : Glycine-rich, cytoskelton-associated protein	MLC : Myosin light chain
Cbfl : Centromere-binding factor 1	MTs : Microtubules
CENP : Centromere protein	MTOC : Centre organisateur des MTs
CLASP : CLIP associated protein	NE : Nuclear envelope
CLIP : Cytoplasmic linker protein	NEB : Nuclear envelope breakdown
CLIPR : CLIP-170 related protein	nm : Nanomètre
CREST : Calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dismotility, sclerodactyly, telangiectasia	NUD : Nuclear distribution
Ct : Carboxy-terminal	NUM1 : Nuclear migration 1
CYLN2 : Cytoplasmic linker protein 2	NuMA : Nuclear protein that associates with the mitotic apparatus
D/D : Dynéine/dynactine	$\mu\text{m}$ : Micromètre
DHC : Chaîne intermédiaire de la dynéine cytoplasmique	$\mu\text{M}$ : Micromolaire
DLIC : Chaîne légère intermédiaire de la dynéine cytoplasmique	Nt : Amino-terminal
DLC : Chaîne légère de la dynéine cytoplasmique	P : Toward the pôle
DIC : Chaîne intermédiaire de la dynéine cytoplasmique	PAR : Partitioning-defective protein
DLB : Dendritic lamellar body	pb : Paire de bases
DRF : Diaphanous-related formin	PCR : Polymerase chain reaction
DsRed : <i>Discosoma</i> red fluorescent protein	Pi : Phosphate inorganique
EB1 : End binding 1	PIN : Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase
EDTA : Ethanyldiamino tetraacidic acid	PoCLIP : Peroxysome associated CLIP
eGFP : Enhanced GFP	PS1 : Presenilin 1
FRAP : Fluorecence recovery after photobleaching	Rod : Rough deal
GAP : GTPase-activating protein	Rp3 : Retinitis pigmentosa 3
GDP : Guanosine-diphosphate	RT-PCR : Reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction
GEF : Guanine-nucleotide-exchange factor	S : Unité Svedberg
GFP : Green-fluorescent protein	SDS-PAGE : Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
GMPCPP : Guanylyl-( $\alpha$ , $\beta$ )-méthylène-diphosphonate	siRNA : Petit ARN interférant
GoLD : Golgi localization domain	SPB : Spindle pôle body
GST : Glutathione S-transferase	TcTex1 : t-complex testis expressed 1
GTP : Guanosine-triphosphate	Tea1p : Tip elongation aberrant protein 1
GTP $\gamma$ S : Guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate)	TGN : Trans Golgi network
HA : Hémagglutinine	

+TIPs : Plus-end-tracking proteins

Tip1p : Tea inducing protein 1

TOR : Target of rapamycin

TPM : Tampon de microinjection

TPX2 : Targeting protein for Xklp2

UV : Ultra-violet

VE-DIC : Video-enhanced differential interference contrast

WSCR : Williams syndrome critical region

XCTK2 : *Xenopus* carboxy-terminal kinesin 2

XKAP : *Xenopus* kinesin II-associated protein

XKCM1 : *Xenopus* kinesin with central motor domain 1

Xkid : *Xenopus* kinesin-like DNA-binding protein

XMAP215 : *Xenopus* MAP de 215 KDa

ZW10 : Zest white 10

# *Introduction*

---

## Avant-propos

Le terme de CLIP-170 désigne la protéine de lien cytoplasmique de 170 KDa, isolée par Rickard et Kreis (1990). *In vitro*, elle constitue un lien statique entre les endosomes et les microtubules. Par immunodétection, elle est localisée sur les endosomes, sur les bouts (+) des microtubules ainsi que sur les kinétochores prémétaphasiques non associés au fuseau de division. En chacun de ces points la CLIP-170 se co-distribue avec le complexe moteur dynéine/dynactine. Les auteurs ont initialement établi un modèle de fonctionnement de concert de ces trois protagonistes : la CLIP-170 établirait le lien statique initial entre le cargo et le microtubule. Le complexe dynéine/dynactine serait recruté sur le cargo. Une fois le moteur associé au microtubule, le lien statique serait levé, rendant possible le mouvement.

Ce modèle offrait une explication attrayante aux données d'immunolocalisation. Toutefois, le fonctionnement de concert de la CLIP-170 et du moteur moléculaire nécessitait que l'on puisse trouver une interaction, qu'elle soit directe ou non, entre les protagonistes.

*Au cours de ma thèse, j'ai participé à la découverte d'un lien physique indirect entre la CLIP-170 et le complexe moteur dynéine/dynactine. Les travaux présentés dans ce manuscrit mettent en évidence une interaction directe de la CLIP-170 avec LIS1. LIS1 est une protéine capable de s'associer aux microtubules, ainsi qu'au complexe moteur dynéine/dynactine dont elle régule l'activité.*

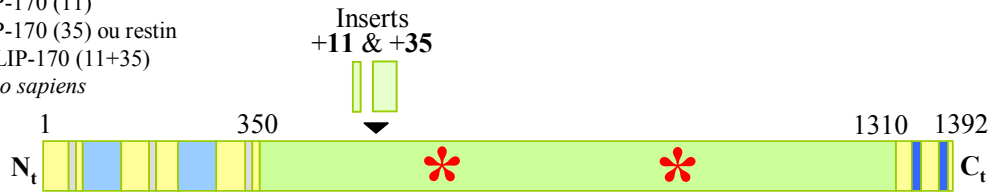
LIS1 intervient comme intermédiaire entre la CLIP-170 et le moteur moléculaire. Elle est requise pour l'adressage du complexe moteur aux bouts (+) des microtubules et celui de la CLIP-170 aux kinétochores prémétaphasiques.

*J'ai participé à l'étude visant à définir la dépendance d'adressage des trois protagonistes sur ces deux structures d'intérêt. En mettant en œuvre la technique de FRAP, il m'a été possible d'étudier la cinétique de renouvellement de la CLIP-170 et de LIS1 aux kinétochores. Enfin, dans ce manuscrit, je présente la caractérisation de deux nouveaux outils permettant d'interférer avec l'adressage de la CLIP-170 : la microinjection d'anticorps et l'expression de siRNA.*

*Ces outils constituent un formidable moyen de perturber le fonctionnement de la CLIP-170, et permettront dans un avenir proche de définir son rôle tant en interphase qu'en mitose. Au cours de l'introduction qui suit, nous définirons la famille des CLIPs avant de nous interroger sur les fonctions de la CLIP-170 en interphase et en mitose.*

**CLIP-170**

CLIP-170 (11)  
CLIP-170 (35) ou restin  
et CLIP-170 (11+35)  
*Homo sapiens*



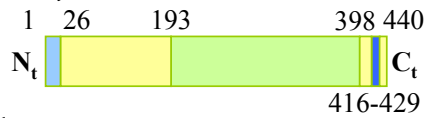
**D-CLIP-190**

*Drosophila melanogaster*



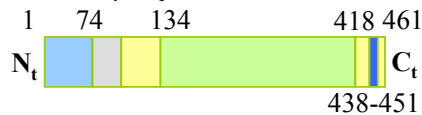
**BIK1**

*Saccharomyces cerevisiae*



**Tip1p**

*Schizosaccharomyces pombe*



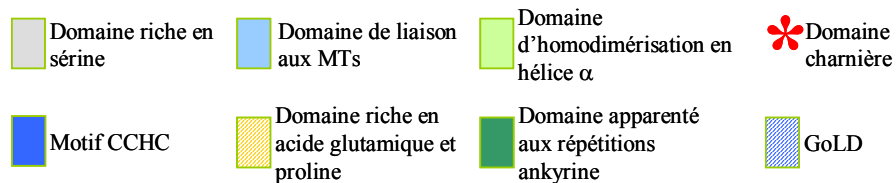
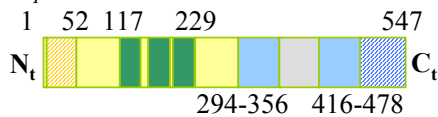
**CLIP-115**

*Rattus norvegicus*



**CLIPR-59**

*Homo sapiens*



**Figure 1 :**

Schéma d'organisation des protéines des familles de CLIPs.

D'après (Berlin *et al.*, 1990; Brunner et Nurse, 2000; De Zeeuw *et al.*, 1997; Griparic et Keller, 1999; Griparic et Keller, 1998; Griparic *et al.*, 1998; Lantz et Miller, 1998; Perez *et al.*, 2002; Pierre *et al.*, 1994).

## Introduction

### I. Les familles de CLIPs

Le terme de CLIPs pour Cytoplasmic Linker Proteins ou protéines de lien cytoplasmique désigne une vaste famille de protéines partageant des propriétés fonctionnelles et/ ou structurales. L'équipe de Thomas Kreis (Pierre *et al.*, 1992) a initialement défini les CLIPs comme une nouvelle classe de protéines assurant l'interaction d'organelles avec les microtubules (MTs). Par la suite, d'autres groupes ont rapproché leurs protéines d'intérêt de cette famille, sur la base d'une analogie structurale avec certains domaines de son prototype : la CLIP-170. Il convient ainsi de définir deux sous-familles au sein du groupe des CLIPs, basées soit sur l'analogie fonctionnelle, répondant à la définition initiale, soit sur la présence d'un domaine apparenté à la CLIP-170.

#### A. Le prototype des CLIPs : la CLIP-170 :

*La CLIP-170 existe sous plusieurs formes résultant d'un épissage alternatif :*

Le gène codant pour la CLIP-170 humaine est présent sur le chromosome 12, au niveau du locus 12q24.3. Il comporte 23 exons dont l'épissage alternatif conduit à la formation de messagers codant pour au moins 2 protéines identifiées à ce jour. Les produits des deux transcrits nommés restin et CLIP-170 ont été isolés par deux cribles différents.

##### *1. La CLIP-170 :*

La **CLIP-170** a été initialement documentée comme pouvant interagir de manière ATP dépendante avec les MTs (Rickard et Kreis, 1990; Rickard et Kreis, 1991). Le transcrit de la pp170 isolé à partir de cellules humaines HeLa (Pierre *et al.*, 1992) possède une phase de lecture comportant 4176 pb, codant une protéine de 1399 résidus acides aminés dont la masse moléculaire estimée est de 159 KDa. L'analyse de sa séquence primaire révèle la présence de trois grands domaines structuraux (**figure 1**).

##### *a) La CLIP-170 lie les MTs via deux motifs de type CAP-Gly :*

Le premier tiers amino-terminal de la protéine s'étend du résidu 1 à 350. Il est organisé sous la forme d'un domaine allongé d'environ 35 nm, qui pourrait se replier et

donner lieu à une petite structure globulaire (Scheel *et al.*, 1999). Il comporte deux répétitions de 57 résidus acides aminés formant un motif de type **CAP-Gly** (glycine-rich cytoskeleton-associated protein, résidus 57 à 114 et 210 à 267), partagé par plusieurs protéines capables d'interagir avec le cytosquelette de tubuline (Riehemann et Sorg, 1993). Parmi ces protéines, on trouve BIK1, l'orthologue de la CLIP-170 chez *S. cerevisiae*, et la p150<sup>Glued</sup>, une sous-unité de la dynactine que nous évoquerons ultérieurement.

En utilisant une construction codant pour les 347 premiers résidus de la CLIP-170, (Pierre *et al.*, 1992) ont démontré que ce domaine basique pouvait lier les MTs *in vivo* et *in vitro*. De plus, des mutations ponctuelles, opérées au sein du motif consensuel **PXGKNDG** des deux domaines CAP-Gly abolissent sa liaison aux MTs. Ces données indiquent que le premier tiers de la protéine est nécessaire et suffisant pour l'interaction de la CLIP-170 avec les MTs.

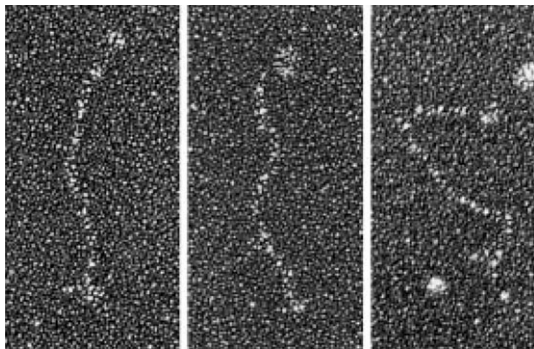
Des données récentes de cristallographie, publiées en 2002, rendent compte de la structure tridimensionnelle de tels domaines (Li *et al.*, 2002) au sein de la protéine F53F4.3 chez *C. elegans*. Bien qu'il existe un motif consensuel minimum au sein de ce domaine, sous la forme de la séquence **GKN(D/S)G**, les auteurs mettent en exergue l'importance des séquences adjacentes dans la modulation de l'affinité du motif pour les MTs. A ce titre, il est à noter que les deux CAP-Gly (au sens large) de la CLIP-170 sont bordés de séquences riches en sérine, potentiellement phosphorylables.

Rickard et Kreis ont mené les premiers tests sur le lien entre l'état de phosphorylation de la CLIP-170 et sa capacité de lier les MTs (Rickard et Kreis, 1991). A l'époque, ils avaient abouti à un dogme simple : l'hyper-phosphorylation de la pp170 par une activité kinase associée aux MTs entraîne son détachement des MTs, tandis que son association est rendue possible lorsqu'elle est hypo-phosphorylée. L'utilisation d'un inhibiteur de sérine phosphatase, l'acide okadaïque avait justement permis de pointer les domaines riches en sérine de la CLIP-170 comme des points chauds de phosphorylation. Comme nous le verrons plus tard, la découverte d'une interaction entre la CLIP-170 et l'orthologue humain de la sérine kinase TOR (target of rapamycin aussi appelée mTOR, FRAP ou RAFT, (Choi *et al.*, 2002)) a complexifié le problème de la régulation par phosphorylation. Il apparaît en effet que la phosphorylation de la CLIP-170 sur ces sérines par FRAP augmente son affinité pour les MTs.



**b) La CLIP-170 est un dimère :**

Le second tiers de la protéine s'étend du résidu 350 à 1310. Il est organisé sous la forme d'un bâtonnet long de 135 nm (Scheel *et al.*, 1999). Il comporte 116 répétitions d'un motif organisé en heptade, partagé par plusieurs protéines structurales filamenteuses comme la kératine, les myosines et le fibrinogène (pour revue, voir (Lupas, 1996)). Ce domaine en hélice  $\alpha$ , dit structure en 'coiled-coil', est responsable de l'homodimérisation de la CLIP-170, comme suggéré par (Pierre *et al.*, 1992) et démontré par (Scheel *et al.*, 1999). Bien qu'aucun résidu proline ne vienne interrompre la structure, deux régions charnières ont été mises en évidence au sein de l'hélice  $\alpha$  : la première autour du résidu 600, la seconde à proximité du résidu 1050. L'existence de ces deux éléments confère à la molécule une certaine flexibilité, comme vu sur les microphotographies présentées en **figure 2**.



**Figure 2 :**

Clichés de microscopie électronique de la CLIP-170 humaine issue du placenta. Cette figure illustre la flexibilité conférée à la molécule par la présence de deux éléments charnières, au sein du domaine en 'coiled-coil'.

D'après (Scheel *et al.*, 1999)

**c) La CLIP-170 lie les cargos via deux motifs de type doigt de zinc :**

Le dernier tiers de la protéine s'étend du résidu 1310 à 1392. Il est organisé sous la forme d'un domaine globulaire de 15 nm (Scheel *et al.*, 1999). Il comporte 2 motifs en "doigt de zinc", de type boîte "CCHC".

Ce motif a été identifié lors d'une recherche systématique de séquences pouvant lier un ion métallique (Berg, 1986). Le terme de boîte CCHC fait référence aux résidus conservés du motif, dont la séquence consensuelle générale est  $CX_2CX_4HX_4C$ . (**tableau 1**, (Green et Berg, 1990)) ont démontré que la liaison d'un ion zinc ou cobalt induit le bon repliement de ce domaine.

Ce motif est présent dans les protéines résultant de l'expression des gènes rétroviraux de type *gag* et au sein de protéines de la nucléocapside des particules virales comme NCp7 de HIV-1. D'un point de vue fonctionnel, ces domaines sont à l'origine de deux types d'interactions :

- des interactions de type protéine-acide nucléique, spécifiques, comme démontré dans le cas du doigt de zinc amino-terminal de la protéine de la nucléocapside de HIV-1 (South et Summers, 1993) ;
- des interactions de type protéine-protéine, comme démontré pour l'interaction entre la protéine de la nucléocapside de HIV-1 NCp7 et la protéine Vpr, impliquant les deux domaines en doigt de zinc de NCp7 (de Rocquigny *et al.*, 1997).

L'altération du motif CCHC par mutagenèse dirigée abolit ces interactions, comme démontré dans le cas de la protéine de la nucléocapside du virus du sarcome de Rous (Meriç *et al.*, 1988).

La CLIP-170 possède deux motifs CCHC. Le premier, dit 'proximal', s'étend du résidu 1333 à 1347. Etant le moins conservé des deux, puisqu'il possède une cystéine additionnelle, ce motif n'a initialement pas été retenu comme doigt de zinc potentiel jusqu'à ce que la séquence primaire de la CLIP-170 soit étudiée par (Riehemann et Sorg, 1993). Le second motif (dit 'distal', résidus 1373 à 1386) quant à lui répond aux exigences de la classification en boîte CCHC.

CXXCX-XXXHXXXXC Consensus  
 CFNCG-KEGHIARNC gag  
 CDICDCFDLHDTEDC CLIP-170 (proximal)  
 CEICE-MFGHWATNC CLIP-170 (distal)

**Tableau 1 :**

Alignement des séquences du motif CCHC de la protéine gag et de ceux de la CLIP-170. La CLIP-170 possède deux boîtes CCHC dont la plus distale est la plus conforme au consensus.

D'un point de vue fonctionnel, (Pierre *et al.*, 1994) avaient suggéré que la portion carboxy-terminale de la CLIP-170 pourrait être impliquée dans son adressage sur des structures telles que les endosomes. En effet, la délétion de ses 132 derniers résidus abolit cet adressage. En mitose, comme nous le verrons plus tard, la CLIP-170 est présente sur les kinétochores pré-métaphasiques non encore associés au fuseau de division. (Dujardin *et al.*, 1998), en utilisant cette même construction ont démontré que ce domaine est essentiel à l'adressage de la CLIP-170 sur ces structures.

Ces données indiquent donc que le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170, contenant les deux motifs CCHC est nécessaire à son adressage sur ses cibles cellulaires. Dans les deux exemples, il apparaît que la CLIP-170 est adressée à une structure sur le point d'être transportée. Nous discuterons plus tard de la fonction de la CLIP-170, mais nous pouvons d'ores et déjà suggérer qu'elle pourrait établir un lien initial entre un élément prêt à être transporté et le réseau microtubulaire. L'ensemble de ces structures sera par la suite

appelé cargo. Nous définirons donc par cargo, tout élément cellulaire susceptible d'être transporté (vésicule, kinétochore/chromosome, complexe moléculaire etc...)

Outre sa fonction dans l'adressage sur des structures subcellulaires, (Scheel *et al.*, 1999) ont mis en évidence un rôle potentiel du domaine contenant les boîtes CCHC dans l'interaction CLIP-170/ MTs. En effet, une forme tronquée de la protéine, dépourvue du dit domaine présente une affinité accrue pour les MTs, en comparaison à la protéine pleine longueur.

Enfin, nous savons que les motifs CCHC peuvent être impliqués dans des interactions de type protéine-protéine. (Johnsingh *et al.*, 2000) ont mis en évidence une interaction entre le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 et la boucle cytoplasmique de la presenilin 1 (PS1). Des mutations dans ce domaine de la PS1 sont trouvées dans approximativement 50% des cas connus de la forme familiale précoce de la maladie d'Alzheimer. A ce titre, la CLIP-170 présente plus d'affinité pour la PS1 mutée par rapport à la forme sauvage de la protéine. Les auteurs ont mis en évidence que cette interaction était abolie par l'ajout d'EDTA (1mM). Ce dernier résultat met en avant l'importance de la présence d'ions divalents pour l'interaction, sans doute en permettant le repliement correct de la protéine et la formation des deux structures tridimensionnelles en "doigt de zinc".

*Les résultats présentés dans le cadre de cette thèse décriront la mise en évidence d'un nouveau partenaire de la CLIP-170, l'interaction dépendant de l'intégrité de son domaine carboxy-terminal.*

## **2. La restin :**

Comme nous l'avons vu, la CLIP-170 pourrait être impliquée d'une manière ou d'une autre dans une forme familiale de la maladie d'Alzheimer, à survenue précoce. La CLIP-170 a été récemment définie comme un auto-antigène (Griffith *et al.*, 2002) chez trois types de patients, atteints de sclérodémie (durcissement et dégénérescence du derme), de glioblastome (tumeurs de la glie) ou d'effusion pleurale idiopathique.

Le second variant du messenger code pour la **restin** (Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease-expressed intermediate filament-associated protein, (Bilbe *et al.*, 1992)). La protéine résultante ne diffère de la CLIP-170 que par une insertion de 35 résidus (soit 7 heptades) située au sein du domaine en coiled-coil (**figure 1**). La restin a été isolée comme une protéine

fortement exprimée par les cellules de Reed-Sternberg dans la maladie d'Hodgkin (Bilbe *et al.*, 1992; Delabie *et al.*, 1993; Delabie *et al.*, 1992).

La maladie d'Hodgkin est caractérisée par une prolifération cellulaire anormale au sein d'un ou plusieurs ganglions lymphatiques. Les cellules tumorales, dites de Reed-Sternberg, sont de grande taille (20 à 30  $\mu\text{m}$  de diamètre), possèdent un noyau polylobé et parsèment irrégulièrement les tissus ganglionnaires. L'origine de ces cellules restent controversée : elles sont soit de nature lymphoïde, soit de type macrophagique. La localisation subcellulaire de la restin met en évidence une distribution en fagots, entourant le noyau (Bilbe *et al.*, 1992). Les auteurs notent une co-localisation partielle avec les filaments intermédiaires de vimentine et ont postulé que la restin pourrait constituer un nouveau membre de cette famille. Les filaments intermédiaires sont fortement résistants aux traitements par des détergents, par conséquent, si la restin en est un membre, on doit la retrouver dans une fraction insoluble. Les expériences menées ont réfuté cette hypothèse : les auteurs ont donc classé la restin comme une IFAP (intermediate filament associated protein).

Néanmoins, si l'on rapproche ces données des phénotypes connus de surexpression de la CLIP-170, on s'aperçoit d'une coïncidence de localisation des deux protéines et des propriétés des structures formées. En effet, tout comme la surexpression de la restin, la surexpression d'une forme pleine longueur de la CLIP-170 conduit à la formation de fagots qui cerclent le noyau et sont résistants aux drogues déstabilisant les MTs (Pierre *et al.*, 1994). Le point critique de l'article de (Bilbe *et al.*, 1992), qui sera corrigé par (Sahin *et al.*, 2002), est l'absence d'une immunodétection de la tubuline, révélant que la forte expression de la restin (tout comme celle de la CLIP-170) modifie la structure du réseau microtubulaire, et le réorganise en fagots.

*La restin n'est donc pas une IFAP, mais une protéine dont la forte expression induit une profonde restructuration du réseau de microtubules.*

A ce jour, aucune étude n'a été menée visant à établir le gain fonctionnel de l'insertion des 35 résidus. La plupart des études menées, tirant partie des techniques d'immunofluorescence, sont réalisées en utilisant des anticorps dirigés contre les domaines communs à la CLIP-170 et à la restin, rendant la discrimination entre les deux variants impossible.

### 3. D'autres produits de l'épissage alternatif ?

C'est au cours de la recherche l'orthologue de la CLIP-170 chez le poulet que (Griparic *et al.*, 1998) ont mis en évidence l'épissage alternatif conduisant à la formation de deux messagers codant pour la CLIP-170 et la restin. Une analyse approfondie des ADNc obtenus par RT-PCR a permis de mettre en évidence l'existence de deux messagers supplémentaires, apparentés à ceux de la CLIP-170/restin (Griparic et Keller, 1998).

Le premier messenger code pour une CLIP-170 possédant en lieu et place de l'insert restin de 35 résidus, un insert de 11 résidus. L'analyse de sa séquence révèle une forte homologie entre les 11 acides aminés trouvés chez le poulet et chez l'homme, puisque 8 d'entre eux sont identiques entre les deux espèces. La particularité de ce motif est la présence d'une proline, qui interrompt le motif d'homodimérisation en hélice  $\alpha$ . Le produit de la traduction de ce messenger a été appelé **CLIP-170 (11)**.

Le second messenger code pour une CLIP-170 possédant les deux inserts : l'insert de 11 résidus précèdent immédiatement celui de 35 résidus. Cette forme, appelée **CLIP-170 (11+35)** est présente chez les deux espèces étudiées.

L'étude du patron d'expression des 4 transcrits révèle le caractère ubiquitaire des ARNm de la CLIP-170 et de la CLIP-170 (35) ou restin, tant chez l'homme que chez le poulet (Griparic *et al.*, 1998). Il est à noter qu'à ce jour le cerveau est le seul tissu qui semble contenir plus de transcrits codant la restin que ceux codant la CLIP-170. Si l'on s'intéresse au muscle cardiaque au cours du développement, on s'aperçoit que la forme CLIP-170 (35) est présente dans le tissu adulte, et absente des tissus embryonnaires. L'abondance des transcrits de la CLIP-170 ne change pas au cours du développement, pour ce tissu. Au contraire, les formes CLIP-170 (11) et (11+35) sont abondantes dans les tissus embryonnaires pour disparaître chez l'adulte. Par ailleurs, il semble que la présence de ces deux transcrits soit restreinte au seul tissu musculaire. Il est important de préciser que l'utilisation en western-blot d'anticorps dirigés contre les domaines communs aux 4 formes de CLIP-170 a permis de confirmer l'existence de 4 protéines correspondant aux 4 transcrits identifiés.

Il apparaît donc que la CLIP-170 existe sous au moins 4 formes différentes, dont la quantité de messenger varie en fonction du type cellulaire et de l'étape du développement considérée. L'apport fonctionnel des inserts de 11 et/ou 35 résidus n'a à ce jour pas été déterminé, faute de réactifs spécifiques de l'une ou l'autre des isoformes. Par ailleurs, l'étude évoquée ici n'apporte d'éléments que sur la nature et la quantité des messagers d'intérêt. Pour

les raisons évoquées précédemment, nous ne pouvons tirer de conclusion sur la prédominance d'une forme protéique par rapport aux autres.

### ***Les trois orthologues connus de la CLIP-170 humaine :***

#### ***4. La D-CLIP-190 :***

La **D-CLIP-190** pour *drosophila* CLIP de 190 KDa a été identifiée comme partenaire d'une myosine non conventionnelle de type VI, la *drosophila* 95F (Lantz et Miller, 1998). Elle s'apparente à la CLIP-170 par son organisation structurale : elle comporte en effet les trois mêmes domaines structuraux que ceux définis pour la CLIP-170. Elle présente 34,5% d'identité avec la protéine humaine et 53% de similitude. Les deux motifs CAP-Gly ainsi que les deux boîtes CCHC sont conservées. La divergence réside dans la séquence primaire de la région dite en coiled-coil, plus longue chez la D-CLIP-190 (**figure 1**).

Son interaction avec la myosine 95F a été mise en évidence par immunoprécipitation. Une co-détection des deux protéines a permis d'observer plusieurs points de co-localisation : le pôle postérieur de l'embryon de drosophile, mais aussi sur des structures ponctiformes, probablement de nature vésiculaire, dans les projections axonales des neurones du système nerveux central (jour 14-16 du développement embryonnaire).

L'ensemble de ces données suggère un rôle de la D-CLIP-190, complexée à la myosine 95F dans le lien entre le réseau microtubulaire et celui d'actine et/ou dans la capacité des vésicules d'utiliser l'un ou l'autre des réseaux comme support de transport.

#### ***5. BIK1 :***

**BIK1**, pour bilateral karyogamy defect a été identifié comme le produit d'un gène requis pour la fusion nucléaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Trueheart *et al.*, 1987), dont la masse moléculaire est de 57 à 60 KDa. L'analyse de sa séquence primaire permet de définir trois domaines fonctionnels identiques à ceux de la forme humaine (**figure 1**), et en font ainsi l'orthologue probable de la CLIP-170. Elle comporte du côté amino-terminal un seul domaine de liaison aux MTs de type CAP-Gly, suivi d'un domaine d'homodimérisation en hélice  $\alpha$  (27 répétitions du motif 'heptade'), puis d'un seul motif CCHC (Berlin *et al.*, 1990). D'un point de vue fonctionnel, (Lin *et al.*, 2001) ont mis en évidence que le domaine CAP-Gly de BIK1 est équivalent à celui de la CLIP-170. Une chimère constituée du premier motif de la CLIP-170 et du reste de BIK1 se comporte strictement comme la protéine BIK1 native.

En interphase, la chimère BIK1-3GFP se localise sous forme de points, le long des MTs cytoplasmiques. Cette localisation est dynamique puisque la protéine suit l'extrémité polymérisante des MTs. Ce comportement, permet de la classer dans la catégorie des +TIPs (plus end tracking proteins) que nous détaillerons ultérieurement (Lin *et al.*, 2001; Schuyler et Pellman, 2001a). La protéine se localise également au SPB (spindle pôle body, (Berlin *et al.*, 1990)). En mitose, la chimère BIK1-3GFP conserve les localisations interphasiques et est également détectée sur les MTs formant le fuseau de division (Berlin *et al.*, 1990). Par ailleurs, BIK1 est présente dans le noyau sous forme de structures bilobées, à l'emplacement des kinétochores. La perte de BIK1 ou sa substitution par une forme amputée de son domaine CCHC (domaine responsable de son adressage aux KT) provoque une diminution de la distance inter-centromérique en pré-anaphase. Ce phénotype est révélateur d'un défaut d'interaction KT/MT, probablement assurée par BIK1 (Lin *et al.*, 2001).

Un argument supplémentaire attestant du lien entre CLIP-170 et BIK1 vient de l'identification d'un des partenaires de cette dernière. En effet, l'orthologue de FRAP, TOR1 a été démontré comme interagissant avec BIK1 (Choi *et al.*, 2000). TOR1 pourrait phosphoryler BIK1 et ainsi modifier son affinité pour les MTs, tout comme le couple d'orthologues correspondant chez les mammifères.

## 6. *Tip1p* :

**Tip1p**, pour 'tea inducing protein 1' a été identifiée lors d'un crible visant à isoler les gènes dont la surexpression génère une modification de la morphologie de *Schizosaccharomyces pombe* (Brunner et Nurse, 2000). L'ADNc correspondant code une protéine de 461 résidus acides aminés, dont la masse moléculaire est de 53 KDa (Jannatipour et Rokeach, 1998). Tout comme BIK1, Tip1 possède trois domaines fonctionnels identiques à ceux de la forme humaine (**figure 1**). La structure des deux équivalents fonctionnels de la CLIP-170 chez les levures est comparable. Ces données permettent de définir Tip1p comme l'orthologue de la CLIP-170 chez *Schizosaccharomyces pombe*.

En interphase, Tip1p se localise de manière dynamique à l'extrémité des MTs en cours de polymérisation. La protéine est également présente au cortex des deux extrémités de la cellule. En mitose, Tip1p se localise sur l'extrémité des MTs astériens. Après la division nucléaire, Tip1p retrouve sa localisation interphasique, sur les MTs émergeant dans la zone médiane (Brunner et Nurse, 2000).

La surexpression de Tip1p est à l'origine d'un défaut de polarisation du réseau microtubulaire dont la conséquence est la génération de cellules courbées, ou en forme de T (Brunner et Nurse, 2000). Dans un contexte sauvage, Tip1p agit comme un facteur empêchant la dépolymérisation des MTs au contact du cortex cellulaire, à l'exception des deux zones situées aux extrémités de la cellule. Elle permet ainsi aux MTs de croître et de s'orienter progressivement le long du grand axe de la cellule. La délétion du gène *Tip1*, tout comme celle de *BIK1*, conduit à un phénotype affectant la dynamique des MTs : ces derniers sont anormalement courts et le réseau microtubulaire apparaît désorganisé. Ce phénotype s'explique par le fait que la transition polymérisation/dépolymérisation (appelée 'catastrophe') ne se limite plus au cortex des deux points extrêmes de la cellule, mais à l'ensemble de son cortex. En revanche, l'organisation du fuseau mitotique n'est pas affectée, et son élongation en anaphase se déroule normalement. En interphase, la localisation corticale, aux extrémités de la cellule du facteur de polarisation Tea1p ('tip elongation aberrant protein 1', (Mata et Nurse, 1997)) est abolie. Ce défaut de localisation pourrait être à l'origine du phénotype morphologique décrit plus haut. Il est à noter que la localisation de Tea1p dépend du domaine carboxy-terminal de Tip1p, contenant un exemplaire de la boîte CCHC. Dans le cadre de cette délétion, la dynamique des MTs reste inchangée. A l'inverse, la délétion du gène codant pour Tea1p abolit l'adressage de Tip1p aux extrémités de la cellule, alors que sa localisation sur les MTs demeure inchangée. Bien qu'aucune interaction directe entre Tea1p et Tip1p n'ait pu être mise en évidence, l'implication du motif CCHC dans des interactions de type protéine-protéine peut-être avancée.

*L'analyse de la structure de la CLIP-170 ainsi que celle de ses orthologues permettent d'émettre des hypothèses quant à sa/ses fonction(s).*

*Toutes ces protéines contiennent un ou deux motif(s) de liaison aux microtubules. La CLIP-170 et ses orthologues sont capables de lier ces structures, et plus particulièrement leur extrémité la plus dynamique. On a pu voir que BIK1 et Tip1p sont capables d'agir comme facteur anti-catastrophe : peut-on évoquer une conservation de cette fonction chez le mammifère ?*

*Toutes ces protéines contiennent un ou deux motif(s) de type CCHC. Ce motif est responsable de l'adressage de BIK1 aux kinétochores et de la localisation de Tea1p au cortex des extrémités de la cellule chez Schizosaccharomyces pombe. Le motif CCHC de la forme humaine de la CLIP-170 constitue-t-il également un motif d'adressage de la CLIP-170*



humaine aux kinétochores ? Est-il impliqué dans la ségrégation de facteur de polarisation cellulaire ? Permet-il l'établissement d'interactions de type protéine-protéine ?

## **B. CLIPs liant un cargo aux microtubules :**

De nombreuses protéines ont été identifiées, apparentées d'un point de vue structural à la CLIP-170. Dans la plupart des cas, les protéines proposées au titre de CLIP sont 1) soit des protéines permettant d'établir un lien entre un cargo et les MTs ; 2) soit des protéines présentant une homologie structurale avec une portion de la CLIP-170 sans que l'analogie fonctionnelle soit effective. Afin de clarifier le vaste domaine des protéines de la famille CLIP, nous nous proposons d'établir une nouvelle classification. Dorénavant, nous définirons deux classes de protéines.

La première, **la famille des CLIPs** à proprement parler, rassemblera l'ensemble des protéines établissant un lien entre un cargo et le réseau microtubulaire **ET** présentant une homologie structurale partielle avec le membre fondateur, la CLIP-170.

La seconde, appelée **famille des protéines à domaine CLIP-170**, rassemblera l'ensemble des protéines ne présentant qu'une homologie structurale avec le membre fondateur.

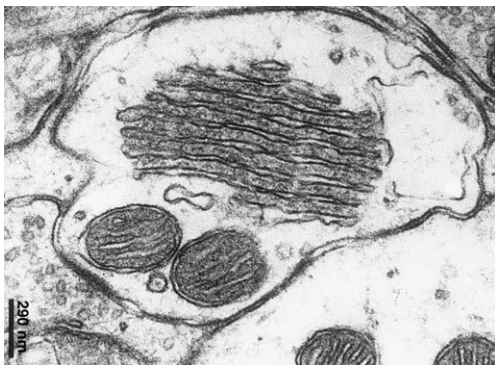
### ***1. La CLIP-115, un paralogue de la CLIP-170 :***

Le gène *CYLN2* (cytoplasmic linker protein 2) codant pour la **CLIP-115** humaine est présent sur le chromosome 7, au niveau du locus 7q11.23 (Hoogenraad *et al.*, 1998). Il comporte 16 exons. Cette région, appelée WSCR (Williams syndrome critical region), peut-être le siège d'une micro-délétion, constatée chez 95% des patients atteints du syndrome de Williams. Cette délétion n'est généralement présente qu'à l'état hémizygote et résulterait d'une recombinaison au sein du chromosome concerné.

Le syndrome de Williams est une anomalie du développement associant une dysmorphie du visage dite 'faciès d'elfe' (yeux écartés, grande bouche, front élargi, nez retroussé, joues proéminentes, menton fuyant, anomalies des dents ...), une sténose aortique supra-valvulaire (diminution du calibre de l'aorte située au-dessus des valves et empêchant le retour du sang de l'aorte vers le ventricule gauche), un retard mental léger, des troubles du comportement et de la coordination motrice. La WSCR comprend plusieurs gènes dont la délétion occasionne une partie du syndrome. Ainsi, la délétion du gène codant pour l'élastine est impliquée dans la dysmorphie cranio-faciale et la sténose aortique (Tassabehji *et al.*,

1997). Récemment, (Hoogenraad *et al.*, 2002) ont obtenu une lignée de souris KO inducible pour le gène *CYLN2*. Les auteurs ont ainsi contribué à élucider la participation du gène *CYLN2* au phénotype observé. Ils ont pu établir que le défaut de CLIP-115 est à l'origine du retard de croissance, ainsi que des problèmes de mémoire contextuelle observés. Ils ont lié ce défaut de mémorisation à la diminution de la plasticité synaptique des neurones de l'hippocampe. Enfin, les souris *CYLN2*<sup>+/-</sup> ont permis d'établir le lien entre cette diminution du niveau d'expression de CLIP-115 et les défauts de coordination motrice constatés dans le syndrome de Williams.

La CLIP-115 a été identifiée comme une protéine contaminante, réagissant avec un anticorps initialement dirigé contre la boucle extracellulaire de connexine 43 (De Zeeuw *et al.*, 1995; De Zeeuw *et al.*, 1997). Elle se localise sur la face externe d'une nouvelle structure membranaire, appelée 'dendritic lamellar body' (DLB, **figure 3**). Les DLBs ne sont trouvés que dans le bourgeon dendritique des neurones de l'olive inférieure, de l'hippocampe, du cortex piriforme et du bulbe olfactif. Même si leur fonction reste à ce jour inconnu, il semble qu'ils pourraient avoir un rôle dans le couplage électrotonique entre neurones. En effet, chez l'adulte les DLB sont trouvés dans les régions du cerveau où existent de nombreuses jonctions communicantes. En microscopie électronique, la CLIP-115 se localise dans l'espace de 60 nm situé entre les saccules. Comme nous allons le voir, la CLIP-115 possède une forte homologie de structure avec la CLIP-170, notamment par le fait qu'elle porte un double motif de liaison aux MTs (**figure 1**). De la conjonction de sa localisation aux DLBs et de son analogie structurale avec la CLIP-170, (De Zeeuw *et al.*, 1997) ont été amenés à proposer que la CLIP-115 pourrait assurer l'interaction des DLBs avec les MTs.



**Figure 3 :**

Cliché de microscopie électronique représentatif de DLBs, un empilement de saccules membranaires, espacés de 60 nm environ, présents dans les bourgeons dendritiques de l'olive inférieure de rat.

D'après (De Zeeuw *et al.*, 1995).

Le clonage de l'ADNc de la CLIP-115 a révélé une phase de lecture codant pour une protéine constituée de 1046 résidus acide aminés, dont la masse moléculaire déduite est de 115 KDa. La séquence primaire de la protéine rend compte de deux domaines fonctionnels distincts.

Tout comme la CLIP-170, la CLIP-115 comporte dans sa portion amino-terminale un double motif de type CAP-Gly, entouré de trois domaines riches en sérines (De Zeeuw *et al.*, 1995; Hoogenraad *et al.*, 2000). La CLIP-115 se co-localise avec la CLIP-170 à l'extrémité la plus dynamique des MTs (Hoogenraad *et al.*, 2000). Cette liaison aux MTs dépend du domaine amino-terminal, et plus particulièrement des deux CAP-Cly. Cependant, les deux motifs n'ont pas la même affinité pour la tubuline : le second motif interagit plus fortement que le premier. Les deux derniers motifs riches en sérines augmentent cette affinité. Comme pour la CLIP-170, la liaison aux MTs est augmentée lorsque la CLIP-115 est hypophosphorylée. Aucune étude n'a été menée à ce jour sur l'implication de FRAP dans la régulation de cette interaction, mais l'homologie de séquence entre les deux protéines laisse entrevoir une régulation commune.

Le domaine immédiatement adjacent contient des motifs en heptades, répétés, caractéristiques d'une structure de type 'coiled-coil'. Ce second domaine est impliqué dans l'homodimérisation de la protéine (Hoogenraad *et al.*, 2000). L'interaction entre les deux monomères de CLIP-115 semble être renforcée par la présence de ponts di-sulfure entre les résidus cystéine situés dans la portion carboxy-terminale du domaine en hélice  $\alpha$ . Toute comme celui de la CLIP-170, ce domaine est requis pour la formation de fagots de MTs, dans le cadre d'une surexpression de la CLIP-115. Néanmoins, dans ces conditions, le phénotype obtenu est légèrement différent d'une CLIP à l'autre. En effet, alors que la surexpression de la CLIP-170 dans les cellules COS1 provoque une formation de fagots de MTs préférentiellement en périphérie de cellule, celle de la CLIP-115 conduit à la formation de fagots circulaires, entourant le noyau (Hoogenraad *et al.*, 2000). Cette différence de phénotype pourrait s'expliquer au niveau structural par l'absence des deux boîtes CCHC présente chez CLIP-170, dont on sait par ailleurs qu'elles interviennent dans la régulation de l'interaction CLIP-170/MTs (Scheel *et al.*, 1999).

La similitude entre CLIP-115 et CLIP-170 laisse penser que les deux protéines pourraient avoir des fonctions redondantes. L'analyse de la localisation de la CLIP-170 dans des fibroblastes issus de souris *CYLN2*<sup>-/-</sup> met en évidence un recrutement accru de la CLIP-170 sur les extrémités les plus dynamiques des MTs (Hoogenraad *et al.*, 2002). Il est à noter qu'il s'agit bien d'une augmentation du recrutement de cette dernière, puisque ni la quantité de son messager, ni la quantité de protéine ne sont affectées. A l'inverse, la surexpression d'une CLIP-115 dépourvue de son domaine d'homodimérisation (absence de formation de fagots) déplace la CLIP-170 des ces même extrémités. Ces deux expériences montrent que les

deux CLIPs sont en compétition pour la liaison aux MTs, où elles pourraient remplir des fonctions proches.

La convergence des données structurales et fonctionnelles des deux CLIPs permet de définir la CLIP-115 comme un paralogue de la CLIP-170. Il reste néanmoins à définir si la CLIP-115 est réellement une protéine assurant un lien cytoplasmique. En effet, (Hoogenraad *et al.*, 2002) ont rapporté que dans la lignée *CYLN2<sup>-/-</sup>*, l'absence de CLIP-115 n'affecte ni la morphologie, ni la localisation des DLBs. Les auteurs en déduisent que la CLIP-115 n'a pas de fonction dans l'interaction des DLBs avec les MTs, sans pour autant prévoir la possibilité d'une protéine dont la fonction serait redondante. A ce propos, aucune expérience n'a été publiée permettant d'exclure la présence de la CLIP-170 sur de telles structures...

## **2. Deux membres potentiels de cette famille :**

### **a) La CLIPR-59 :**

Le gène codant pour la **CLIPR-59** (CLIP-170 related protein of 59 KDa) humaine est présent sur le chromosome 19, au niveau du locus 19q13. Il comporte 14 exons. La CLIPR-59 a été isolée lors d'une recherche de séquences analogues à celle de la CLIP-170.

La CLIPR-59 comporte à son extrémité amino-terminale un domaine riche en acide glutamique et proline dont la fonction reste à déterminer (**figure 1**, (Perez *et al.*, 2002)). La portion de protéine qui suit présente une triple répétition d'un motif apparenté aux répétitions ankyrine. Ce type de motif pourrait être à l'origine d'interactions de type protéine-protéine (Michaely et Bennett, 1993). Un des arguments permettant de classer la CLIPR-59 dans la famille des CLIPs est la présence d'un tandem de motifs CAP-Gly, séparés, tout comme dans le cas de la CLIP-170, par un domaine riche en sérines. La portion carboxy-terminale, correspondant aux 60 derniers résidus acides aminés, porte un nouveau signal de localisation sur les membranes de l'appareil de Golgi appelé GoLD pour "Golgi localization domain".

La CLIPR-59 est ubiquitaire, mais particulièrement abondante dans le cerveau. D'un point de vue subcellulaire, elle se localise sur les membranes réseau trans-Golgien. Aucune localisation n'est disponible à ce jour permettant d'affirmer que cette protéine se localise sur les MTs. Néanmoins, il semblerait que l'environnement des deux CAP-Gly défavorise l'interaction avec les MTs. En effet, la simple délétion du domaine GoLD permet d'observer une localisation de la CLIPR-59 sur une sous-population de MTs dont la nature reste à déterminer (Perez *et al.*, 2002). A l'évidence, l'expression d'une forme de CLIPR-59 ne

comportant que les deux CAP-GLY est capable de lier les MTs, tout comme le feraient les domaines correspondant de la CLIP-115 ou CLIP-170. La surexpression de cette forme de CLIPR-59 ou de la forme pleine longueur de la protéine n'entraîne pas de formation de fagots de MTs. Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu dans le cadre de l'expression de la portion amino-terminale de la CLIP-115 ou -170 incapable de se dimériser. (Hoogenraad *et al.*, 2000) avait mis en évidence que la formation de fagots de MTs nécessitait une forme dimérisée de la protéine. La question se pose donc de la fonction des CAP-Gly de la CLIPR-59, mais aussi du caractère monomérique ou multimérique de cette protéine *in vivo*.

De l'ensemble de ces données, les auteurs ont tiré un modèle dans lequel les deux CAP-Gly ne seraient pas accessibles par défaut. La séquence d'évènements débiterait par l'adressage de la protéine aux membranes du trans Golgi/TGN. Une fois en place, la CLIPR-59 pourrait subir une modification conformationnelle et/ou post-traductionnelle démasquant les deux CAP-GLY. Cette étape rendrait possible l'interaction de l'organite avec une sous-population de MTs le long desquels il serait transporté de manière moteur moléculaire dépendante.

*Comme pour la CLIP-170, il reste à démontrer que la CLIPR-59 est une protéine de lien cytoplasmique in vivo, médiant l'interaction entre les membranes du trans Golgi/TGN et les microtubules. L'absence d'évidences permettant d'affirmer que la CLIPR-59 lie les microtubules in vivo nous amène à la classer dans la catégorie des membres potentiels de la famille des CLIPs liant un cargo aux microtubules.*

#### **b) La PoCLIP :**

Le terme de **PoCLIP** pour peroxysomes associated CLIP est un membre potentiel de la famille des CLIPs liant les peroxysomes aux MTs. (Thiemann *et al.*, 2000) ont décrit un système permettant de quantifier *in vitro* la fixation des peroxysomes aux MTs. Ce système a été mis en œuvre afin d'identifier les facteurs responsables de cette interaction. Dans le cadre de ces expériences, ils ont pu mettre en évidence que l'addition au milieu réactionnel d'un anticorps dirigé contre le domaine amino-terminal de la CLIP-170, porteur des deux CAP-Gly, abolit la liaison des peroxysomes aux MTs. Cet anticorps utilisé sur ces extraits révèle la présence d'une protéine de 70 KDa. La protéine détectée n'est donc ni la CLIP-115, ni la CLIP-170, mais possède un épitope en commun avec ces deux protéines. Des expériences réalisées sur des peroxysomes traités avec des protéases ou de la *N*-ethylmaleimide ont démontré que l'interaction entre ces organites et les MTs dépend non seulement de la

PoCLIP, mais également d'un récepteur membranaire à cette protéine. L'ADNc codant pour cette protéine reste à identifier.

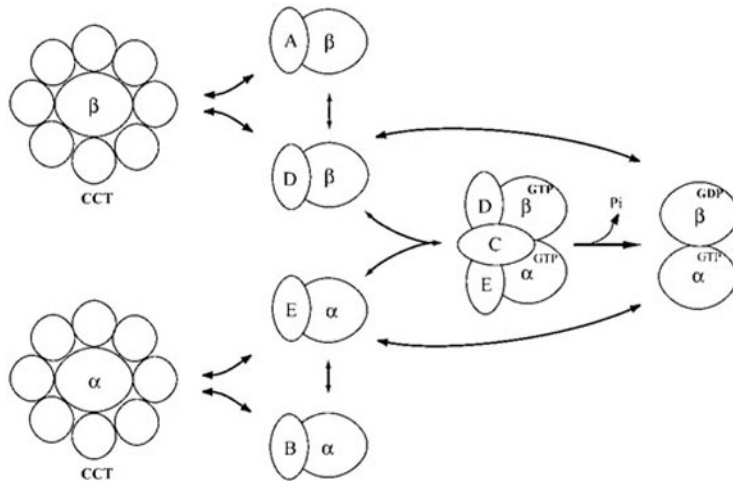
### C. Protéines à domaine CLIP-170 :

Cette dernière catégorie rassemble l'ensemble des protéines comportant au moins un domaine apparenté à la CLIP-170.

La **CLIP-50** est une protéine apparentée à la CLIP-170, fortement exprimée dans le testicule de souris (Tarsounas *et al.*, 2001). Son homologie avec la CLIP-170 réside dans le fait qu'elle reprend la quasi totalité de son domaine carboxy-terminal, depuis le résidu 1046. Elle comporte donc plusieurs motifs en heptade du coiled-coil, ainsi que les deux boîtes CCHC. Sa fonction reste inconnue. Elle se localise au niveau de points de nucléation des MTs, à proximité du noyau des spermatides et pourrait être impliquée dans les changements morphologiques affectant le noyau du futur spermatozoïde, lors de la spermiogenèse.

La **p150<sup>Glued</sup>** est l'une des sous-unités du complexe dynactine, le complexe activateur du moteur moléculaire MT dépendant appelé dynéine (pour revues, voir (Allan, 1996b; King, 2000b; Schroer, 1996)). Nous reviendrons plus tard sur l'implication de ces deux complexes dans le mouvement d'organites et la régulation de la dynamique des MTs. La p150<sup>Glued</sup> comporte un unique motif d'interaction avec les MTs, similaire à celui de la CLIP-170.

Deux protéines de la famille des cofacteurs de repliement de la tubuline portent ce même motif, non répété : le **cofacteur B** et le **cofacteur E**. La traduction de l'ARNm codant les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  s'effectue dans le cytoplasme où la chaîne peptidique est reconnue par une protéine dite chaperonine CCT (**figure 4**). Le complexe CCT/ $\alpha$ -tubuline est reconnu par le cofacteur B qui prend seul en charge la poursuite du processus de repliement de la tubuline. Ce cofacteur va être ensuite échangé avec le cofacteur E. De manière concomitante, la tubuline  $\beta$  subit un processus similaire, impliquant les cofacteurs A puis D. Le cofacteur C prend en charge l'assemblage du complexe cofacteur E/ $\alpha$  tubuline avec le complexe cofacteur D/ $\beta$  tubuline. Le cofacteur C est relargué après que la  $\beta$  tubuline ait hydrolysé le GTP qui lui est lié. Les trois cofacteurs sont recyclés et le dimère  $\alpha\beta$  de tubuline est libéré. Du fait de la spécificité des cofacteurs B et E pour la tubuline  $\alpha$ , on pourrait penser que l'unique motif CLIP-170 présent sur ces protéines est capable de discriminer les deux formes de tubuline (pour revues, voir (Lewis *et al.*, 1997; Nogales, 2000)).



**Figure 4 :**

Représentation schématique des événements moléculaires conduisant au bon repliement des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  monomérique, et à leur association en dimère mixte  $\alpha\beta$ . CCT désigne la chaperonine reconnaissant la chaîne peptidique de tubuline en cours de synthèse. Les lettres A à E désignent les cofacteurs impliqués dans les étapes ultérieures de repliement et d'assemblage.

D'après (Nogales, 2000).

*La famille des CLIPs semble donc permettre une interaction entre organites et MTs. La famille des protéines apparentées contient des membres qui ne font que reprendre partiellement certaines fonctions de la CLIP-170, comme, par exemple, la liaison aux MTs. Dans les deux sections suivantes, nous nous attacherons à décrire les fonctions cellulaires connues de la CLIP-170 pendant deux périodes de la vie de la cellule : l'interphase et la mitose. Nous verrons que le registre d'action de cette protéine ne se limite pas simplement à l'établissement d'un lien statique entre endosomes et MTs.*

## II. Quelle(s) fonction(s) pour la CLIP-170 en interphase ?

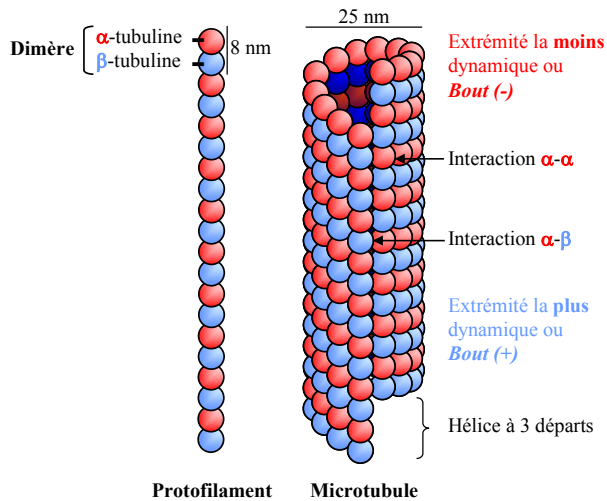
La CLIP-170 est une protéine bipolaire : son domaine amino-terminale lui permet de s'associer aux MTs tandis que son extrémité carboxy-terminale est responsable de son adressage sur des structures telles que les endosomes. Nous allons à présent voir que la CLIP-170 présente d'autres fonctions *in vivo*. Elle est capable d'influencer la dynamique des MTs et pourrait participer au mécanisme aboutissant à leur ancrage cortical. Nous allons à présent développer les différentes fonctions interphasiques connues pour la CLIP-170, ainsi que les intervenants moléculaires impliqués.

### A. Le réseau microtubulaire :

#### 1. Les microtubules sont des hétéro-polymères : leur structure :

Les **tubulines  $\alpha$  et  $\beta$**  sont deux protéines de 50 KDa chacune, dont les séquences protéiques partagent 50% d'identité. Le cofacteur C (voir plus haut) assemble les deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  en un hétéro-dimère, une "brique élémentaire" à l'origine du protofilament. Chaque **protofilament** résulte de l'assemblage linéaire de dimères de tubulines, respectant l'alternance  $\alpha/\beta$  (**figure 5**). Au sein du dimère libre, chacun des monomères est lié à une molécule de GTP. L'association  $\alpha/\beta$  entrave le GTP porté par la tubuline  $\alpha$ , à l'interface entre les deux sous-unités. Ce GTP n'est ni échangé, ni hydrolysé par la sous-unité  $\alpha$ . Pour cette raison, le site d'association du GTP sur la tubuline  $\alpha$  est dit site N pour "non-échangeable". La tubuline  $\beta$ , dispose également d'une poche renfermant un nucléotide. A l'inverse de la tubuline  $\alpha$ , la tubuline  $\beta$  est capable d'hydrolyser son GTP en GDP+Pi. Cette réaction se produit lorsque la sous-unité  $\beta$  d'un dimère capte la sous-unité  $\alpha$  d'un second dimère : au sein du MT, la tubuline  $\beta$  est une GTPase tubuline  $\alpha$ -dépendante (David-Pfeuty *et al.*, 1977). La poche renfermant le GTP/GDP au sein de la sous-unité de tubuline  $\beta$  est appelée site E pour "échangeable", qualifiant ainsi le comportement du nucléotide qu'il renferme. De l'alternance des monomères de tubuline au sein du dimère naît l'asymétrie structurale du protofilament puis celle du MT. L'extrémité dite bout (+) expose de la tubuline  $\beta$ , alors que la second, dite bout (-) est constituée de tubuline  $\alpha$ .





**Figure 5 :**

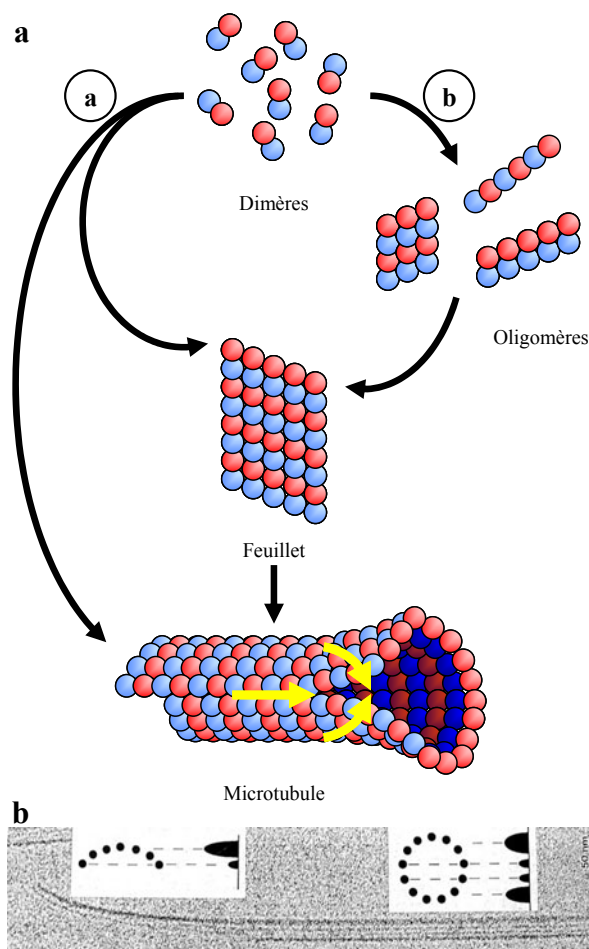
Représentation schématique d'un protofilament et d'un microtubule.

Chaque protofilament est constitué de l'assemblage en alternance de tubuline  $\alpha$  et de tubuline  $\beta$ . Treize protofilaments s'associent latéralement, de manière décalée, afin de constituer la paroi d'un cylindre creux, le microtubule. Ce décalage est à l'origine d'une interaction hétérologue entre tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ , donnant naissance à une "cicatrice".

D'après (Song et Mandelkow, 1993).

Les **microtubules** sont des structures cylindriques creuses de 25 nm de diamètre, constituées de l'association latérale de 13 protofilaments (**figure 5**). L'analyse directe des clichés de microscopie électronique ne permettait pas de définir le mode d'assemblage relatif des 13 protofilaments au sein du MT. Deux modèles s'opposent alors (Amos et Klug, 1974). Le premier, dit en treillis A (ou lattice A), propose un assemblage latéral des protofilaments où les sous-unités de même nature décrivent une hélice continue sur la totalité de la circonférence du MT. Dans ce modèle, deux sous-unités adjacentes de même nature sont décalées de 3,1 nm. En utilisant un peptide correspondant au seul domaine moteur de la kinésine du calmar (Kosik *et al.*, 1990), on peut augmenter le contraste de ces clichés. Les auteurs ont pu mettre en évidence que l'interaction kinésine/MT se fait au niveau de la tubuline  $\beta$  de chaque dimère. En suivant l'arrangement moléculaire d'un des 2 types de tubulines sur la circonférence du MT, on s'aperçoit qu'il forme une spirale interrompue. Dans ces expériences, deux sous-unités adjacentes de même nature apparaissent décalées de 0,9 nm. Cette structure rend compte d'un départ simultané de 3 hélices. Ces données expérimentales correspondent au second modèle envisagé par les auteurs, l'organisation dite en treillis B. L'interaction latérale entre protofilaments se fait entre sous-unités de même nature (interactions  $\alpha$ - $\alpha$  ou  $\beta$ - $\beta$ ), à l'exception d'une zone d'interruption de l'hélice. Cette zone de décalage est la conséquence du démarrage simultané des trois hélices décrites plus haut. Cette zone d'interaction hétérologue  $\alpha$ - $\beta$ , thermodynamiquement moins stable, est un point de fragilité du MT, d'où le terme de "cicatrice" (Song et Mandelkow, 1993). Elle résulte du mode de formation du MT, que nous allons décrire.

Une question se pose : comment passer d'une structure linéaire, de protofilaments, à cette structure tubulaire ? L'analyse ultrastructurale par microscopie électronique a permis de révéler la conformation de l'extrémité des MTs (**figure 6**). Trois études concordantes décrivent une structure partiellement fermée à ses extrémités (Chretien *et al.*, 1995; Mandelkow *et al.*, 1991; Simon et Salmon, 1990). Le corps du MT est cylindrique, comme décrit plus haut. Le bout (+) du MT forme un feuillet ouvert. Le corps du MT résulterait de la fermeture d'un feuillet de protofilaments. La jonction des deux bords du feuillet, à l'origine de la "cicatrice", se ferait à la manière d'une fermeture éclair procédant du corps du MT vers son extrémité.



**Figure 6 :**

Modèles d'assemblage d'un microtubule.

**a-** Deux modèles sont proposés. Le premier, présenté sur la chaîne a, propose une oligomérisation directe des dimères de tubulines en feuillets. Ces derniers se ferment afin de former le microtubule. Le second, présenté sur la chaîne b, introduit une étape intermédiaire d'oligomérisation. Ces précurseurs complexes s'associent pour former le feuillet qui donne lieu au microtubule.

**b-** Clichés d'un microtubule observé par microscopie électronique après cryo-fixation. L'image est légèrement défocalisée afin de faire apparaître un ombrage caractéristique de la disposition relative des protofilaments. Le schéma d'interprétation de gauche correspond au corps du microtubule, constitué des 13 protofilaments. Les deux bandes étroites, sombres et centrales correspondent à la superposition de 2 protofilaments situés à l'avant et l'arrière du microtubule. Les deux bandes larges, sombres et périphériques correspondent à la superposition de 4 ou 5 protofilaments situés à l'avant et l'arrière, sur le bord du microtubule.

Le schéma d'interprétation de droite correspond au bout (+) du microtubule, qui apparaît incomplet. Cette extrémité forme un feuillet ouvert.

D'après (Chretien *et al.*, 1995; Valiron *et al.*, 2001).

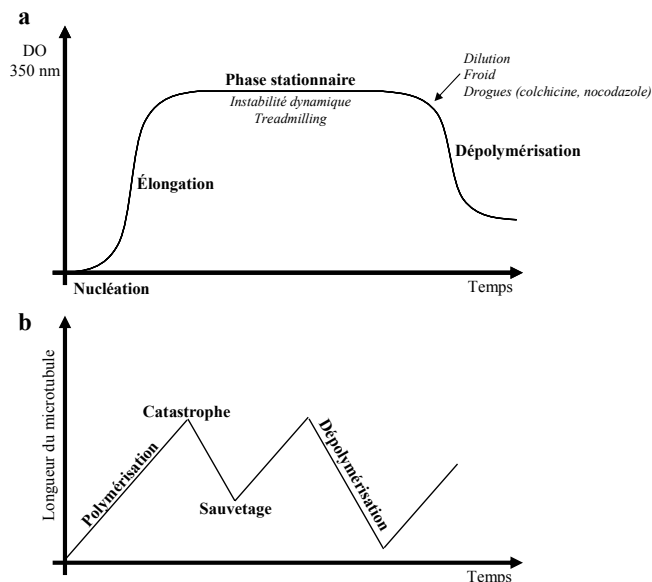
L'assemblage du MT démarre par une phase dite de **nucléation** (**figure 7a**). Cette étape implique la formation d'une structure élémentaire, le noyau, sur lequel viendront s'arrimer de nouveaux dimères de tubulines. La formation du noyau est la phase indispensable qui engage la formation du MT. Plusieurs modèles ont été proposés, décrivant la formation du noyau. Tous s'accordent sur le pré-requis de 6 à 12 dimères de tubulines pour entamer la formation d'un point de nucléation (Flyvbjerg *et al.*, 1996; Voter et Erickson, 1984).

Néanmoins, aucun consensus n'a été trouvé sur la nature du noyau lui-même : s'agit-il d'oligomères, de protofilaments ou déjà d'un feuillet ? Une fois les noyaux en place, commence la phase d'**élongation** : à 30-37°C, le dimères de tubulines doublement chargés en GTP s'incorpore aux MTs en formation. Dans ces conditions, la concentration en tubulines est un facteur important. Aussi a-t-on défini la "**concentration critique**" comme la concentration tout juste suffisante pour promouvoir la formation de MTs. *In vitro*, si l'on utilise exclusivement de la tubuline purifiée, cette concentration est d'environ 14µM (Mitchison et Kirschner, 1984). L'apparition des polymères provoque une augmentation de la turbidité de la solution, qui peut être suivie en analysant l'absorbance du milieu réactionnel à 350 nm. La troisième étape, dite **phase stationnaire** ou "**steady-state**", intervient ensuite. Aucun changement d'absorbance n'est visible indiquant que la masse totale de polymères est invariable pendant cette période. Comme nous allons le voir, le terme de phase stationnaire ne désigne pas un état figé du MT, bien au contraire.

## 2. Les microtubules sont des structures dynamiques :

### a) La dynamique des microtubules *in vitro* :

#### (1) L'instabilité dynamique :



**Figure 7 :**

Instabilité dynamique des microtubules

**a-** En suivant la turbidité d'une solution de tubulines, on met en évidence trois phases caractéristiques de l'assemblage des microtubules : une période de nucléation lente, une phase d'élongation rapide qui atteint un plateau correspondant à l'étape stationnaire.

**b-** Au cours de la phase stationnaire, les microtubules alternent élongation et dépolymérisation. Cette instabilité dynamique est caractérisée par quatre paramètres : la vitesse de polymérisation, celle de dépolymérisation, la fréquence de catastrophe et celle de sauvetage.

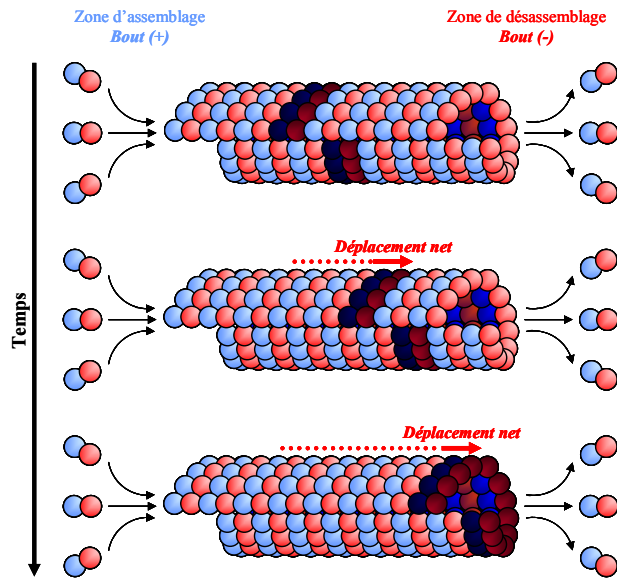
D'après (Valiron *et al.*, 2001).

Pendant la phase stationnaire, l'analyse par microscopie électronique de MTs polymérisés à partir de tubulines purifiées rend compte d'une hétérogénéité de taille. Au cours du temps, deux paramètres sont constants : la concentration en tubulines libres et la concentration en polymères. Deux paramètres varient en sens opposés : la taille des MTs et

leur nombre au sein du milieu réactionnel. Le produit de ces deux paramètres reste constant. (Mitchison et Kirschner, 1984) ont interprété ces données comme rendant compte de la co-existence de deux populations de MTs au cours de la phase dite de "steady-state". La première concerne des MTs dépolymérisant, remettant à flot le stock de dimères de tubulines, disponible pour l'assemblage de la seconde population de MTs, qui eux polymérisent. Sur la base des données de cinétique, les auteurs ont estimé qu'un MT pouvait alterner une phase de dépolymérisation rapide avec une phase de re-polymérisation rapide. Ce comportement, mettant en jeu une alternance entre deux états de polymérisation et de dépolymérisation a été décrit comme l'**instabilité dynamique (figure 7b)**. Elle se caractérise par quatre paramètres : la vitesse de polymérisation, celle de dépolymérisation, ainsi que la fréquence des deux événements de transition de l'un à l'autre. On appelle **sauvetage** (ou "rescue") la transition de l'évènement de désassemblage rapide à celui de d'assemblage lent, le terme de "catastrophe" désignant la transition opposée. L'existence de cette instabilité dynamique des MTs, en absence de facteurs protéiques autres que les tubulines en font une propriété intrinsèque du polymère.

*(2) Le mécanisme de "treadmilling" :*

Comme nous l'avons vu précédemment, les deux extrémités des MTs ne sont pas équivalentes. Les expériences de polymérisation de MTs à partir d'axonèmes rendent comptent d'une différence des vitesses d'assemblage/désassemblage des dimères de tubulines à chacun des bouts des MTs (Mitchison et Kirschner, 1984). L'instabilité dynamique de l'extrémité  $\beta$  tubuline du MT est plus prononcée que celle de l'extrémité  $\alpha$  tubuline. La terminologie qui fait référence à ces propriétés dynamiques définit la première comme bout (+), pour extrémité la plus dynamique, le second bout étant noté bout (-). D'un point de vue global, en se plaçant à l'état stationnaire dans le cadre d'un milieu réactionnel ne contenant que de la tubuline purifiée, cette différence de propriétés conduit à un allongement du bout (+), tandis que le bout (-) rétrécis (**figure 8**). Si l'on observe un groupe de dimères de tubulines au sein d'un MT, cette propriété conduit à un déplacement des dimères en question, depuis le bout (+) en direction du bout (-). Ce phénomène comparable à un tapis roulant est appelé "**treadmilling**" (Margolis et Wilson, 1978; Margolis et Wilson, 1981).



**Figure 8 :**

Le mécanisme de "treadmilling".

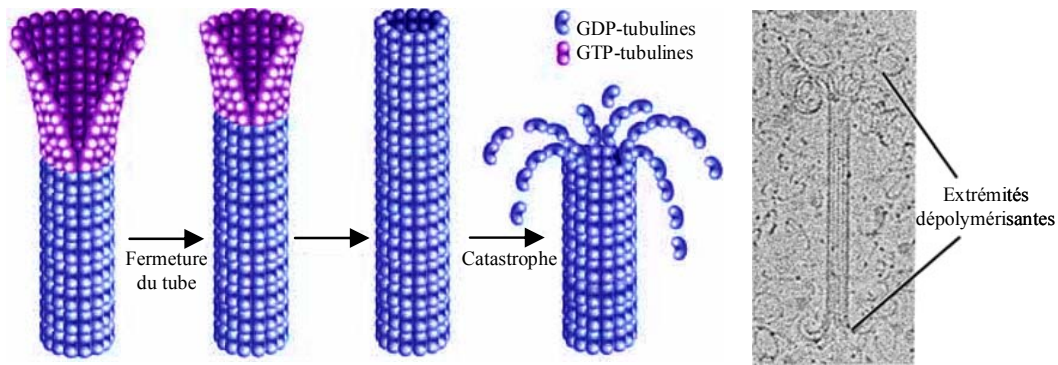
La différence de dynamique propre à chacune des extrémités du microtubule conduit à un allongement net du bout (+), tandis que le bout (-) raccourci. Au cours du temps, il en résulte un déplacement des sous-unités de tubulines constituant la paroi du microtubule.

D'après (Valiron *et al.*, 2001).

Ce mécanisme ne concerne pas que les MTs assemblés *in vitro*. Des expériences de photoblanchiment réalisées sur des mélanophores microinjectés avec de la tubuline fluorescente ont révélées que le treadmilling pouvait être impliqué dans le transport de MTs vers la périphérie de la cellule (Rodionov et Borisy, 1997). Ce mécanisme implique le relargage de MTs par leur centre organisateur (centrosome), la dépolymérisation de son bout (-), pendant que de manière synchrone l'extrémité (+) s'allonge.

### (3) La coiffe GTP et la coiffe structurale :

A la fin des années 70, l'activité GTPasique des MTs a été mise en évidence (David-Pfeuty *et al.*, 1977; David-Pfeuty *et al.*, 1978). Comme nous l'avons vu, les dimères de tubulines portent deux molécules de GTP. L'une des deux molécules va être hydrolysée au sein du MT. Si l'on segmente les MTs en fragments de plus petite longueur, l'activité GTPasique globale augmente proportionnellement au nombre de segments générés. Les auteurs en ont conclu que l'activité GTPasique se localise aux bouts de MTs. Cette activité requiert l'interaction entre une sous-unité  $\beta$  d'un dimère, porteuse du site E, avec la sous-unité  $\alpha$  d'un second dimère. Néanmoins, il existe un délai entre l'incorporation d'un dimère de tubulines au MT et l'hydrolyse du GTP sur son site E (Hyman *et al.*, 1992). (Mitchison et Kirschner, 1984) ont proposé qu'il existe au bout (+) des MTs polymérisant une zone où la tubuline  $\beta$  n'a pas encore hydrolysé son GTP. Les auteurs parlent de **coiffe GTP (figure 9)**.



**Figure 9 :**

Coiffe GTP et coiffe structurale.

Au cours de sa polymérisation, le bout (+) du microtubule apparaît sous la forme d'un feuillet qui se ferme progressivement. Le GTP porté par les dimères de tubulines (en violet) est progressivement hydrolysé en GDP (corps du microtubule, en bleu). Lorsque la coiffe GTP a disparu, la structure du microtubule devient instable. Les protofilaments perdent leur cohésion, se courbent vers l'extérieur puis se détachent du microtubule (voir le cliché de microscopie électronique de droite).

D'après (Hyman et Karsenti, 1996; Lodish *et al.*, 1995).

L'importance de cette coiffe a été mise en évidence en utilisant un analogue du GTP, le GMPCPP dont l'hydrolyse par la tubuline est lente (Hyman *et al.*, 1992). Dans ces conditions, les tubulines polymérisent à la même vitesse qu'en présence de GTP. Néanmoins, l'instabilité dynamique est supprimée. La coiffe GTP pourrait donc avoir un rôle de stabilisation des MTs. En présence de GTP hydrolysable, l'analyse par microscopie électronique de MTs en cours de dépolymérisation révèle un aspect caractéristique des deux extrémités : la cohésion entre protofilaments adjacents est rompue et la paroi du MT s'incurve vers l'extérieur. Ces derniers se détachent du MT en formant des boucles (Chretien *et al.*, 1995; Mandelkow *et al.*, 1991; Simon et Salmon, 1990). En présence de GMPCPP, les dimères de tubulines apparaissent plus long de 1,5 Å par rapport aux dimères liés au GDP (Hyman *et al.*, 1995; Melki *et al.*, 1989).

Les auteurs ont proposé un modèle où l'hydrolyse du GTP, et plus particulièrement la libération du Pi provoquerait un changement de conformation du dimère. Ce modèle est dit de la **coiffe structurale (figure 9)**. L'énergie libérée par l'hydrolyse du nucléotide provoquerait une courbure des dimères de tubulines. Au sein du MT, cette énergie serait maintenue sous forme mécanique. La contrainte imposée par la coiffe GTP empêcherait la libération de cette énergie et maintiendrait les parois du MT droites. La disparition progressive de la coiffe GTP abolirait cette contrainte, permettant la courbure des dimères et le détachement des protofilaments à l'origine de la dépolymérisation du MT.

***b) La dynamique des microtubules in vivo : un exemple de l'implication des MAPs :***

*In vivo*, les MTs sont pour la plupart nucléés à partir d'une structure située à proximité du noyau : le **centrosome**. Chez les eucaryotes supérieurs, il est constitué de deux structures microtubulaires particulières, les centrioles, entourées d'une matrice protéique, la zone péricentriolaire. Celle-ci assure la nucléation des MTs bien en dessous de la concentration critique en tubuline. Les MTs ainsi nucléés sont soit relargués dans le cytoplasme, soit ancrés à proximité du centriole père, morphologiquement distinguable en microscopie électronique par la présence d'appendices (pour revue, voir (Bornens, 2002)). La zone péricentriolaire concentre les extrémités les moins dynamiques des MTs. *In vivo*, l'instabilité dynamique décrite plus haut pourrait ne concerner que l'extrémité distale des MTs. Elle aurait pour rôle de permettre au MTs d'explorer l'espace cytoplasmique, à la recherche de points d'ancrage périphériques. Ces points d'ancrage doivent permettre d'établir un transport vectorisé ou plus généralement une polarisation cellulaire.

La polarisation cellulaire implique que l'instabilité dynamique soit contrôlée, dans l'espace et dans le temps. Ce contrôle se fait en agissant sur les quatre paramètres de l'instabilité dynamique. *In vivo* ces paramètres diffèrent de ceux caractérisant l'instabilité dynamique intrinsèque des MTs, telle que déterminée pour la tubuline pure. Ainsi, pour une même concentration en tubuline, la vitesse de polymérisation des MTs *in vivo* est cinq à dix fois plus rapide comparée à celle des MTs *in vitro*. Ces données impliquent l'existence de facteurs cellulaires susceptibles de modifier la dynamique des MTs. Le terme de MAP pour 'microtubule associated protein' désigne une famille de protéines capables d'interagir avec les MTs. Certains de ses membres sont capables d'influer sur la dynamique instable des MTs.

Plusieurs méthodes ont été mises en œuvre afin d'élucider la fonction des MAPs. Parmi elles, c'est l'utilisation de systèmes reconstitués à partir d'œufs de xénopes qui a permis les avancées les plus marquantes dans le domaine (Gard et Kirschner, 1987). Ce système est modulable puisqu'il permet un contrôle précis du contenu du milieu réactionnel. Ainsi, on peut immuno-dépléter l'extrait ou au contraire le compléter afin de tester la fonction d'une protéine d'intérêt. Cette approche a été mise en œuvre dans le cadre de l'étude de deux MAPs aux fonctions antagonistes : XKCM1 et XMAP215. Dans les lignes qui suivent, nous prendrons l'exemple de ces deux protéines afin d'illustrer le rôle des MAPs dans le contrôle de la dynamique des MTs.

XMAP215 (*xenopus* MAP de 215 KDa), initialement nommée XMAP (Vasquez *et al.*, 1994), a été identifiée comme une MAP capable d'altérer les paramètres de l'assemblage des MTs. En microscopie électronique, XMAP215 apparaît comme une molécule allongée de  $60\pm 18$  nm. Elle s'associe aux protofilaments, sur une longueur couvrant 7 à 8 dimères de tubulines (Cassimeris *et al.*, 2001). En présence d'axonèmes, un extrait d'œufs de xénopes interphasique contenant  $0,2 \mu\text{M}$  de XMAP215 voit la vitesse de polymérisation de ses MTs augmentée d'un facteur 7 à 10, tandis que la vitesse de dépolymérisation est augmentée d'un facteur trois. Dans ces conditions, le suivi des MTs par VE-DIC (Video-enhanced differential interference contrast) révèle que la fréquence du phénomène de sauvetage est quasi nulle (Vasquez *et al.*, 1994). Cet effet semble être spécifique des bouts (+), en dépit d'une localisation de la protéine sur toute la longueur du MT (Tournebize *et al.*, 2000). L'immuno-déplétion de XMAP215 entraîne un défaut de polymérisation des MTs, qui apparaissent anormalement courts (Tournebize *et al.*, 2000). Cet effet peut être contrecarré en réintroduisant la protéine dans le milieu réactionnel. XMAP215 est donc une MAP essentielle pour la stabilisation des MTs.

XKCM1 (*xenopus* kinesin with central motor domain 1) est une MAP de la famille des kinésines, une famille de moteur moléculaire MT dépendent. Elle appartient à la sous-famille Kin I, dont le domaine moteur est situé en position centrale. Il s'agit d'une kinésine non conventionnelle puisqu'elle est dépourvue d'activité motrice et utilise l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour déstabiliser les MTs (Desai *et al.*, 1999; Niederstrasser *et al.*, 2002). XKCM1 se lie aux protofilaments. L'utilisation de la subtiline, une enzyme détachant la queue carboxy-terminale acide des tubulines, abolit cette localisation, permettant ainsi d'identifier le domaine d'interaction de XKCM1 sur ces structures (Niederstrasser *et al.*, 2002). Dans le système acellulaire décrit plus haut, l'absence de XKCM1 est à l'origine de la formation de MTs anormalement longs, et d'une réduction d'un facteur quatre de la fréquence de catastrophe (Walczak *et al.*, 1996). Cet effet peut être contré en réintroduisant la protéine purifiée, à des taux physiologiques. XKCM1 apparaît donc comme une MAP essentielle à la dépolymérisation des MTs.

L'antagonisme apparent entre les effets de XMAP 215 et XKCM1 a poussé les auteurs à étudier les effets combinés d'une double déplétion. Dans ces conditions, la fréquence de catastrophe redevient normale, suggérant que les activités des deux protéines se contrebalancent (Tournebize *et al.*, 2000). Du fait de l'utilisation d'extraits de xénopes, les études réalisées impliquaient la présence d'autres facteurs pouvant avoir eux aussi un effet sur



la dynamique des MTs. (Kinoshita *et al.*, 2001) ont réalisés les mêmes expériences en utilisant les quatre protéines purifiées : les tubulines, XMAP215 et XKCM1. En se plaçant aux concentrations physiologiques de ces quatre composantes, les auteurs ont mis en évidence qu'ils constituaient les facteurs minimaux permettant de mimer *in vitro* l'instabilité dynamique dont les paramètres caractéristiques correspondent à ceux déterminés *in vivo*. XMAP215 et XKCM1 sont donc suffisants pour assurer une instabilité dynamique physiologique.

## **B. La CLIP-170 est une MAP particulière :**

### ***1. La CLIP-170 s'associe aux microtubules polymérisant :***

Comme nous l'avons vu plus haut, la CLIP-170 possède un doublet de motifs de type CAP-Gly, nécessaire et suffisant à son interaction avec les MTs (Pierre *et al.*, 1994). (Rickard et Kreis, 1990) ont pour la première fois décrit la localisation subcellulaire de la CLIP-170 à l'extrémité la plus dynamique des MTs. Les motifs CAP-Gly assurent la localisation tant d'une forme dimérique que monomérique de la CLIP-170 (Diamantopoulos *et al.*, 1999; Pierre *et al.*, 1994). Compte tenu des données biochimiques et structurales des MTs décrites plus haut, (Diamantopoulos *et al.*, 1999) ont émis deux hypothèses permettant d'expliquer la localisation particulière de cette MAP. La première hypothèse tire partie de l'existence de la coiffe GTP et de la coiffe structurale. La CLIP-170 pourrait reconnaître spécifiquement la conformation particulière des tubulines situées à l'extrémité (+) des MTs, et s'y associer. La seconde rend compte de l'homologie structurale des CAP-Gly de la CLIP-170 avec le domaine correspondant des cofacteurs B et E intervenant dans le repliement des tubulines. La CLIP-170 pourrait s'associer aux dimères et/ou oligomères de tubulines et co-polymériser avec eux au bout (+) des MTs.

Afin de tester ces hypothèses, les auteurs ont entrepris d'étudier *in vitro* l'assemblage des tubulines en MTs, en présence de la CLIP-170. Curieusement, dans ces conditions, le fragment H2 (résidus 1 à 481 de la CLIP-170, capable de dimériser (Scheel *et al.*, 1999)) marque toute la longueur des MTs polymérisés à partir de centrosomes isolés et de tubulines-GTP. En réalisant un marquage bref des MTs en cours d'assemblage à l'aide de tubulines-rhodamine, les auteurs ont montré que le fragment H2 s'associe préférentiellement aux MTs nouvellement formés et promeut la nucléation de nouveaux MTs associés au non au centrosome. L'absence de concordance entre les localisations observées *in vivo* et *in vitro* laisse entrevoir deux hypothèses. La première consiste à penser qu'au sein de ce système

synthétique il manque un certain nombre de facteurs (phosphatases, kinases, autres MAPs...) dont le rôle est capital pour l'adressage spécifique de la CLIP-170 aux bouts (+) des MTs. Le second postulat propose que la coiffe GTP obtenue *in vitro* soit plus restreinte que celle obtenue *in vivo*. Les auteurs n'ont envisagé et testé que cette seconde hypothèse. L'ajout de tubulines-GMPCPP couplées à la rhodamine puis du fragment H2 à des MTs polymérisés à partir de tubulines GTP révèle une association quasi exclusive de la CLIP-170 aux MTs libres, nouvellement formés. (Hyman *et al.*, 1992) ont mis en évidence que le GMPCPP promeut fortement l'assemblage de MTs libres. On peut donc supposer que dans les conditions de l'expérience, la seule activité de nucléation présente dans le milieu réactionnel est celle qui implique les tubulines-GMPCPP. Le GTP $\gamma$ S est un analogue du GTP qui, à la différence du GMPCPP, réduit fortement la nucléation spontanée (Roychowdhury et Gaskin, 1986). Dans ces conditions, les MTs sont associés aux centrosomes. La CLIP-170 pleine longueur et le fragment H2 retrouvent leur localisation le long des MTs et dans de rares cas on observe un enrichissement au bout (+). *Par conséquent, il semble que la CLIP-170 soit capables de reconnaître de manière dynamique les MTs en cours de polymérisation.*

L'ensemble de ces expériences répond à un schéma séquentiel : polymérisation des MTs à partir de centrosomes isolés PUIS ajout de tubulines-rhodamine PUIS ajout de H2. (Diamantopoulos *et al.*, 1999) ont réalisé l'expérience en pré-incubant le fragment H2 avec des tubulines-GTP. Dans ces conditions, on observe une association préférentielle de H2 avec les bouts (+) des MTs nouvellement polymérisés. Un fragment plus court de la CLIP-170, H1 (résidus 1 à 350 de la CLIP-170, incapable de se dimériser (Scheel *et al.*, 1999)) est capable d'interagir avec les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ . Des expériences de co-sédimentation réalisées sur les tubulines et H2 révèlent que les protéines sont capables de former plusieurs complexes. En présence de tubulines GDP ou GTP, un complexe est formé dont le coefficient de sédimentation est de 45-48 S, tandis qu'en présence de GTP un second complexe apparaît à 26-28 S. *La CLIP-170 est donc associée à des formes dimériques et/ou oligomériques de tubulines. C'est sous cette forme que la CLIP-170 pourrait être incorporée aux MTs en cours de polymérisation. Comme la CLIP-170 s'associe préférentiellement à des MTs positifs pour cette protéine, elle pourrait être impliquée dans la persistance de la polymérisation des MTs en cours d'extension.*

## 2. La CLIP-170, prototype de la famille des +TIPs :

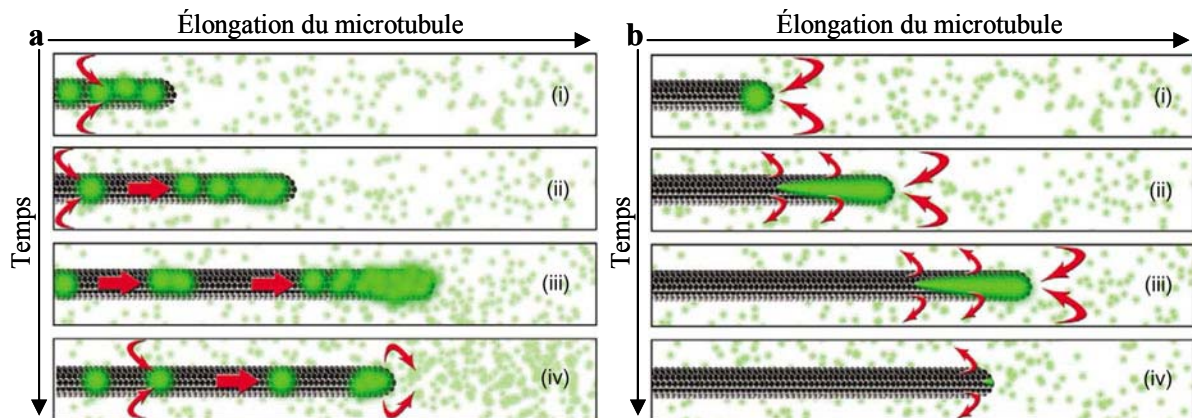
Les développements technologiques en matière de microscopie rapide et d'utilisation de protéines chimérisées à la GFP ont permis d'aborder le problème de la dynamique cellulaire des protéines d'intérêt, sur cellules vivantes.

(Perez *et al.*, 1999) ont abordé la question de l'association dynamique de la CLIP-170 aux MTs *in vivo* en utilisant une construction codant pour la GFP-CLIP-170. Après expression de celle-ci dans les cellules Vero, la CLIP-170 se localise aux bouts (+) des MTs, comme attendu. Le suivi en vidéomicroscopie de la GFP fait apparaître la CLIP-170 sous forme de petites 'comètes' en déplacement, dont le point d'origine est juxtanucléaire et la destination périphérique. La visualisation concomitante de la GFP-CLIP-170 et des MTs a permis d'établir que le point d'origine correspond au centrosome, et que ces 'comètes' représentent l'extrémité la plus dynamique des MTs. Les auteurs ont noté que seuls les MTs en cours de polymérisation montrent ce marquage.

Pour une vitesse de polymérisation donnée, la taille de la 'comète' semble constante mais diminue néanmoins lorsque la vitesse de polymérisation décroît. La constance de cette longueur peut être expliquée de deux façons (**figure 10**, pour revue, voir (Galjart et Perez, 2003)). La première hypothèse conçoit l'accumulation distale de la GFP-CLIP-170 comme le résultat d'un transport antérograde permanent le long du MT. Une kinésine prendrait en charge ce transport. Dans cette hypothèse, on devrait retrouver des points de fluorescence le long des MTs, correspondant à la GFP-CLIP-170 en cours de transport. La seconde hypothèse, plus plausible, propose qu'il existe un ajout de GFP-CLIP-170 à l'avant de la structure, alors que la queue de la comète est le siège de la dissociation de la protéine d'avec les MTs. La GFP-CLIP-170 aurait son propre "treadmilling" sur le MT. Comme nous l'avons vu, l'association de la CLIP-170 avec les MTs dépend de son état de phosphorylation. Outre les hypothèses de co-polymérisation de la CLIP-170 avec des oligomères de tubulines et de reconnaissance d'une coiffe GTP et /ou structurale par cette protéine, on peut supposer qu'une régulation fine et régionalisée de son état de phosphorylation peut expliquer la présence des 'comètes' aux bouts (+).

Aucun auteur n'a à ce jour proposé un modèle d'adressage de la CLIP-170 'par défaut'. En effet, en compilant les données obtenues *in vitro* par (Diamantopoulos *et al.*, 1999) aux observations de (Perez *et al.*, 1999), il apparaît un paradoxe : *in vitro*, la CLIP-170 se localise sur toute la longueur des MTs en cours de polymérisation. Il semblerait donc qu'en l'absence

de tout autre facteur, la CLIP-170 interagissent avec les MTs sans localisation préférentielle. Afin d'expliquer cette différence, on peut émettre une troisième hypothèse. *In vivo*, plusieurs MAPs sont exprimées. Pourquoi ne pas imaginer que l'une d'entre elle se localise précisément sur le corps du MT, riche en GDP ? Si l'on considère que cette MAP et la CLIP-170 sont en compétition pour l'interaction avec les MTs, on entrevoit que seule la coiffe GTP est accessible à la CLIP-170. Au cours de la dépolymérisation du MT, la coiffe GTP disparaît : la MAP putative évoquée plus haut étendrait alors sa zone d'interaction à l'ensemble du MT. La CLIP-170 serait ainsi exclue des MTs en cours de dépolymérisation.



**Figure 10 :**

Deux modèles d'accumulation distale des MAPs.

a- Modèle de l'accumulation distale de la CLIP-170 par **transport actif**. La CLIP-170 est recrutée sur toute la longueur du microtubule. Elle se déplace le long du microtubule, en direction du bout (+), par un mécanisme pouvant mettre en jeu une kinésine. Le bout (+) constituant un 'cul-de-sac', on observe l'accumulation préférentielle de la protéine à cette extrémité. Le point faible de ce modèle réside dans le fait qu'un tel mécanisme doit permettre de visualiser l'accumulation distale tant pendant la polymérisation ((i) à (ii)) que pendant la dépolymérisation du MT ((iii) et (iv)). Ce dernier phénomène n'est jamais observé pour la CLIP-170 *in vivo*.

b- Modèle de l'accumulation distale de la CLIP-170 par **'treadmilling'**. La CLIP-170 co-polymérise avec les tubulines et/ou reconnaît spécifiquement le bout (+) du microtubule (coiffe GTP et/ou structurale) et s'y associe. De manière synchrone, les molécules de CLIP-170 formant l'arrière de la comète sont relarguées dans le cytoplasme. Deux hypothèses, non mutuellement exclusives peuvent être avancées. On peut penser que les modifications conformationelles générées par l'hydrolyse du GTP de la tubuline  $\beta$  et/ou la fermeture du feuillet de protofilaments réduisent l'affinité de la CLIP-170 pour les microtubules. Celle-ci s'en décroche. On peut également imaginer qu'une série de modifications post-traductionnelles dont la CLIP-170 serait la cible puisse influencer son détachement du microtubule.

D'après (Galjart et Perez, 2003).

*Certaines MAPs, très conservées, sont capables de se lier de manière dynamique au bout (+) des MTs in vivo. Tout comme la CLIP-170, elles forment des 'comètes' à l'extrémité des MTs en cours de polymérisation. Ces protéines au comportement analogue à celui de la CLIP-170 forment une nouvelle famille de MAPs, définie par (Schuyler et Pellman, 2001a) comme les +TIPs pour "plus-end-tracking proteins" ou encore "plus-end-treadmilling*

proteins" (pour revues, voir (Galjart et Perez, 2003; Schroer, 2001)). Dans les lignes qui suivent nous allons dresser une liste non exhaustive des +TIPs caractérisées à ce jour.

**a) Le couple EBI/APC :**

La famille **EB1** (end binding 1) constitue un ensemble de protéines conservées depuis les levures jusqu'à l'homme (pour revue, voir (Tirnauer et Bierer, 2000)).

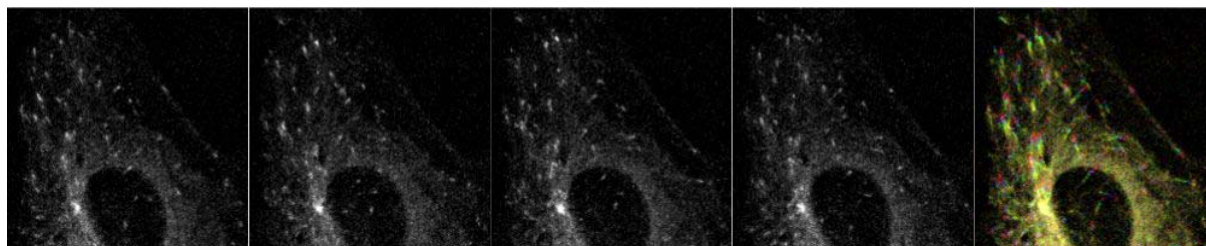
Chez la levure bourgeonnante, son orthologue *Yeb1/BIM1* (binding to microtubules 1, gène *YER016w*) a été isolée lors d'un crible double-hybride, utilisant la totalité de la séquence codant TUB1 comme appât (Schwartz *et al.*, 1997). Chez *S. cerevisiae* le gène *TUB1* code pour la tubuline  $\alpha$ . En situation normale, Bim1p se localise sur les MTs cytoplasmiques et nucléaires probablement *via* une interaction avec la tubuline  $\alpha$ . Au sein d'une souche délétée pour *BIM1*, le fuseau de division apparaît plus court et/ou mal orienté, ayant pour conséquence un défaut de positionnement du noyau au niveau de l'encolure du bourgeon. Cet aspect du phénotype est également retrouvé dans les souches surexprimant *BIM1*. Tout comme les zygotes  $\Delta bik1x\Delta bik1$ , les zygotes  $\Delta bim1x\Delta bim1$  montrent un défaut de caryogamie dont la cause dérive d'une désorganisation des MTs extranucléaires. L'ensemble des ces données semblaient indiquer un rôle de Bim1p dans la régulation de la dynamique des MTs. L'équipe de David Pellman a décrit qu'au cours de la phase G1, les MTs de la souche  $\Delta bim1$  présentent un défaut général de dynamique. Il est caractérisé par une diminution de la vitesse de dépolymérisation, des fréquences de transitions et une augmentation de la durée des temps de pauses marquées par les MTs (Tirnauer *et al.*, 1999). La conséquence est une réduction de la longueur des MTs. Les auteurs ont également redéfini plus précisément la localisation intracellulaire de Bim1p en utilisant une souche où une fusion *GFP-BIM1* a été substituée à *BIM1*. Dans ces conditions, GFP-Bim1p marque l'extrémité la plus dynamique des MTs sous la forme de spots concentrés au bout du MT. La localisation intranucléaire de GFP-Bim1p est identique à celle décrite précédemment (Schwartz *et al.*, 1997). Chez *S. cerevisiae*, Bim1p apparaît donc avoir le comportement caractéristique d'une +TIP.

Chez *S. pombe*, le phénotype observé après délétion de l'orthologue d'EB1, *mal3*, est légèrement différent. Les MTs des cellules *mal3* $\Delta$  apparaissent plus courts (1/5 de la taille des MTs de la souche sauvage), et distribués exclusivement à proximité du noyau. Dans ces conditions, (Beinhauer *et al.*, 1997) n'ont pas constaté de défaut majeur de formation du fuseau de division. Néanmoins, dans de nombreux cas le noyau apparaît déplacé par rapport à la position centrale, normalement adoptée. De même, le lieu de formation du septum est

anormalement modifié. Enfin, la délétion de *mal3* provoque la formation de cellules incurvées et de cellules en forme de 'T'. L'introduction dans cette souche du gène codant pour la forme humaine de mal3p restaure un phénotype sauvage, faisant de *mal3* l'orthologue fonctionnel de EB1.

Chez le mammifère, EB1 (30 KDa) a été isolé par double-hybride comme un partenaire du domaine carboxy-terminal de l'onco-suppresseur APC (adenomatous polyposis coli, 310 KDa, (Su *et al.*, 1995)). Ce domaine fonctionnel est fréquemment muté ou délété dans la forme familiale de la polypose colique adénomateuse (pour revue, voir (Kinzler et Vogelstein, 1996)). La polypose héréditaire se transmet sur une base autosomale dominante. Les polypes mis en cause, dont le nombre excède en général cent, sont des adénomes ou des polyadénomes. Un adénome est une tumeur bénigne touchant une glande ou certaines muqueuses (utérus, côlon, rectum, bronches). Les études par immunofluorescence réalisées sur cellules humaine révèlent une association d'EB1 avec les MTs et le(s) centrosome(s) tant en interphase qu'en mitose (Berrueta *et al.*, 1998). Les mêmes expériences menées sur cellules SV480 dérivée d'un adénocarcinome du colon porteur de la troncation carboxy-terminale d'APC révèlent une localisation inchangée d'EB1. L'association d'EB1 avec les MTs est donc indépendante de son interaction avec APC, dont on sait, par ailleurs qu'elle interagit elle-même avec les MTs (Juwana *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1994). (Morrison *et al.*, 1998) ont affiné la détermination de cette localisation d'EB1 sur cellules fixées, mettant en évidence une interaction quasi-exclusive aux bouts (+) des MTs où la protéine adopte une distribution en "comètes". Cette association dépend de la dynamique des MTs puisque le traitement des cellules avec des drogues anti-MTs (taxol ou nocodazole) provoque une redistribution cytoplasmique réversible de la protéine, qui reste néanmoins associée au centrosome (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000b; Morrison *et al.*, 1998).

L'étude dynamique réalisée par vidéomicroscopie sur les cellules A6 de xénope transfectées par une construction codant pour EB1-GFP montre que le comportement d'EB1 correspond à celui d'une +TIP (**figure 11**). (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000b) mettent en évidence sur cellules vivantes qu'EB1 s'associe exclusivement à l'extrémité des MTs en cours de dépolymérisation ou en pause. La longueur de la 'comète' qu'elle forme au bout (+) est étroitement corrélée à la vitesse de polymérisation du MT.



**Figure 11 :**

Comportement dynamique d'une +TIP : l'exemple d'EB1-GFP.

Vidéomicroscopie 3D+temps de cellules PtK2 exprimant de manière transitoire EB1-GFP (construction fournie par le Dr. Shoichiro Tsukita). Une pile de 8 sections optiques espacées de 300 nm a été enregistrée chaque 2 secondes. Les images présentées sont des projections verticales d'intensité maximale issues de 4 piles d'images déconvoluées successives. L'image de droite correspond à la superposition des 4 images précédentes, une couleur différente étant attribuée à chacune. EB1 y apparaît sous la forme d'une série de "comètes" successives, permettant de visualiser son évolution le long des microtubules en cours de polymérisation.

F. Cordelières, J.-B. Sibarita et J. De Mey, données non publiées.

L'équipe de Shoichiro Tsukita a étudié le comportement dynamique atypique d'APC (pour revue, voir (Bienz, 2002; Fearnhead *et al.*, 2001)). Dans les cellules A6, APC se localise de manière discrète le long des MTs, et est enrichie sous forme d'une "gouttelette" terminale au bout (+) des MTs polymérisant (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000a). La chimère APC-GFP se déplace sous forme de "grains" le long des MTs, en direction de l'extrémité la plus dynamique des MTs où elle s'accumule progressivement. Au cours de la dépolymérisation du MT, le grain terminal s'en détache. Lorsqu'un MT polymérisant contacte ce grain devenu cytoplasmique, il est chargée sur le MT et transporté de nouveau vers le bout (+). Perméabiliser les cellules A6 revient à les dépler en ATP. Dans ces conditions, le transport d'APC est interrompu. Cette expérience met en évidence l'implication d'un moteur ATPasique MT-dépendant dans le phénomène de translocation d'APC. L'utilisation de protéines tronquées met en évidence l'importance du domaine carboxy-terminal d'APC pour son accumulation aux bouts (+) des MTs. Cette portion de la protéine contient les domaines d'interaction avec les MTs et EB1. La portion complémentaire, amino-terminale, est impliquée dans le transport actif de la protéine le long des MTs et pourrait ainsi être le siège d'une interaction avec une kinésine. Cette localisation particulière d'APC au bout (+), en dépit de sa présence le long des MTs polymérisant, en fait un membre atypique de la famille des +TIPs.

EB1 et APC interagissent (Su *et al.*, 1995). Cette interaction existe-t-elle *in vivo* au bout (+) des MTs ? Quelle est sa fonction physiologique ? (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000a) ont démontré qu'*in vivo*, le domaine d'interaction d'APC avec EB1 est requis pour l'adressage de

l'onco-suppresseur au bout (+) des MTs. A l'inverse, EB1 est capable de s'associer à l'extrémité des MTs en absence d'interaction avec APC (Berrueta *et al.*, 1998). L'interaction entre EB1 et APC est régulée : en mitose, le domaine carboxy-terminal d'APC est phosphorylé par p34<sup>cdc2</sup>, abolissant l'interaction avec EB1 (Askham *et al.*, 2000). Cette donnée a été exploitée dans des expériences réalisées *in vitro* où l'activité d'EB1 et/ou C-APC (domaine carboxy-terminal d'APC, dépourvu du domaine de liaison aux MTs) sur la dynamique des MTs a été testée. Individuellement, chacune des protéines n'a aucun effet sur l'assemblage des MTs. En revanche, l'ajout simultané d'EB1 et de C-APC entraîne la polymérisation de MTs au sein d'une solution de tubulines purifiées. Cette activité est inhibée par la phosphorylation de C-APC par p34<sup>cdc2</sup> : cette activité est donc rendue possible par l'interaction des deux protéines (Nakamura *et al.*, 2001). Une fois de plus, il est important de souligner la conservation fonctionnelle entre les orthologues d'EB1 : dans ces expériences, EB1 et mal3p sont interchangeable. L'étude des paramètres de l'instabilité dynamique des MTs a été réalisée en système reconstitué (xénope) déplété pour EB1. EB1 diminue la fréquence de catastrophe, augmente la fréquence de sauvetage ainsi que la vitesse de dépolymérisation, sans modifier celle de polymérisation. EB1 apparaît comme un facteur anti-catastrophe et anti-pause (Tirnauer *et al.*, 2002b). *In vivo*, l'introduction de GFP-C-APC dans des cellules SW480 restaure l'activité de nucléation rapide du centrosome après dépolymérisation des MTs : l'activité fonctionnelle du couple EB1/APC est donc avérée dans un système physiologique.

#### ***b) Le couple dynéine/dynactine :***

Le dynéine cytoplasmique est un complexe moteur qui se déplace le long des MTs en direction de leur extrémité (-) (Paschal et Vallee, 1987). Le complexe dynactine constitue pour la dynéine cytoplasmique à la fois un activateur et un facteur de processivité (Gill *et al.*, 1991; King et Schroer, 2000). Comme nous le verrons plus tard, le complexe dynéine/dynactine (D/D) prend en charge de nombreuses fonctions cellulaires, étant impliqué par exemple dans le transport rétrograde d'organites (Schnapp et Reese, 1989) ou encore le positionnement périnucléaire de l'appareil de Golgi (Harada *et al.*, 1998). C'est en périphérie de cellules que l'on trouve la majeure partie des bouts (+) des MTs, qui sont la voie empruntée par les vésicules d'endocytose pour leur transport rétrograde. Aussi peut-on se demander si ces bouts plus constituent un point de chargement préférentiel des cargos. Dans ce cas, on doit retrouver sur les bouts (+) l'ensemble des protéines impliquées dans ce transport, et notamment les moteurs moléculaires, comme le complexe D/D.



C'est en tentant de répondre à ces questions que l'équipe de Richard Vallee a pour la première fois localisé certains composants du complexe D/D aux bouts (+) des MTs. Sur les cellules COS-7 fixées, la localisation de certains constituants de la dynactine y apparaît clairement : p150<sup>Glued</sup>, Arp1 et p50/dynamitine se co-distribuent avec la CLIP-170 (Valetti *et al.*, 1999; Vaughan *et al.*, 1999). Les modifications post-traductionnelles des tubulines permettent d'estimer "l'âge" d'un MT. Ces modifications s'attachent au domaine carboxy-terminal des tubulines, exposé à la surface du MT. En condition normale, la tubuline  $\alpha$  expose une tyrosine terminale, pouvant être éliminée, exposant ainsi un glutamate terminal. Cette réaction d'hydrolyse est lente, aussi dit-on que les MTs dynamiques sont des "MTs-Tyr", par rapport aux MTs stabilisés ou "MT-Glu". Cette modification n'a pas de conséquences sur la stabilité des MTs mais permet de les "dater" (Webster *et al.*, 1990). La p150<sup>Glued</sup> se localise justement sur les MTs-Tyr et est exclue des MTs-Glu, semblant indiquer qu'elle ne s'associe qu'à l'extrémité (+) des MTs dynamiques. Cette hypothèse a été confirmée *in vivo* par vidéomicroscopie où p150<sup>Glued</sup> montre un comportement analogue à celui de la CLIP-170 : elle s'associe sous forme d'une comète au bouts (+) des MTs en cours de polymérisation (Vaughan *et al.*, 2002). Aucune étude n'a été réalisée à ce jour sur le comportement dynamique des autres membres du complexe dynactine : seule la p150<sup>Glued</sup> apparaît être une +TIP *in vivo* pour le moment.

Actuellement, il est difficile d'affirmer que la dynéine cytoplasmique constitue une véritable +TIP, chez les mammifères. Les seules données disponibles, publiées par (Vaughan *et al.*, 1999) montrent la chaîne intermédiaire de la dynéine cytoplasmique se localisant aux bouts (+) des MTs. Cependant, cette distribution intracellulaire ne peut être mise en évidence que dans des conditions expérimentales particulières : les cellules COS-7 doivent subir une variation de température, de 37°C à température ambiante, afin que l'enrichissement terminal soit constaté. Dans ces conditions, la p150<sup>Glued</sup> est davantage recrutée au bout (+) des MTs, ouvrant la possibilité d'une titration artéfactuelle de la dynéine par le recrutement accru de la dynactine. La variation de température utilisée pourrait également avoir pour conséquence un ralentissement du trafic intracellulaire : les vésicules ayant à subir un transport rétrograde et chargée en D/D pourrait alors avoir été bloquées sur leur lieu de chargement, c'est-à-dire aux bouts (+) des MTs. La localisation de la dynéine observée pourrait résulter d'une accumulation artéfactuelle de ces vésicules. Compte tenu de ces incertitudes, nous n'utiliserons pas ces arguments pour affirmer que la dynéine appartient à la famille des +TIPs.

Une fois de plus, ce sont les données concernant les homologues structuraux des sous-unités de la dynéine chez certains eucaryotes primaires qui apporteront les preuves manquantes. Chez *Aspergillus nidulans*, l'orthologue du gène codant pour la chaîne lourde de la dynéine, NUDA (nuclear distribution, gene A) a été isolé comme l'un des gènes essentiels pour le positionnement correct du noyau (Xiang *et al.*, 1994). L'équipe de Ronald Morris a construit une souche de ce champignon filamenteux où le gène NUDA a été remplacé par une chimère GFP-NUDA. Le suivi de l'orthologue de la chaîne lourde de la dynéine cytoplasmique met en évidence une localisation à l'extrémité la plus dynamique des MTs, sans avoir recours aux variations de températures évoquées plus haut. GFP-NUDA forme une comète au bout (+) des MTs, dont les paramètres de déplacement correspondent à ceux de la polymérisation des MTs (Han *et al.*, 2001; Xiang *et al.*, 2000). (Xiang *et al.*, 2000) ont pu visualiser NUDA associée également à l'extrémité dépolymérisante de certaines MTs. Ces deux types de comportements sont directement dépendant des MTs et de leur dynamique, puisque l'utilisation de drogues anti-MTs, comme le benomyle abolit l'adressage et la dynamique de NUDA. Ce même résultat est obtenu en utilisant une souche contenant une mutation thermosensible de NUDK, l'orthologue de Arp1 : l'adressage de NUDA aux bouts (+) des MTs dépend du complexe dynactine (Xiang *et al.*, 2000). Enfin, d'un point de vue fonctionnel, l'étude de la dynamique des MTs dans une souche mutée pour NUDA montre une diminution de la fréquence de catastrophe, de celle de sauvetage, ainsi que de la vitesse de dépolymérisation. L'absence de NUDA diminue la "dynamisme" des MTs. NUDA apparaît donc comme une +TIP au comportement atypique.

***c) Le couple CLIP-170 & -115/CLASPs :***

Le terme de CLAPs (CLIP associated proteins) désigne un ensemble de protéines, capables d'interagir avec les CLIP-115 et -170. Les CLASPs ont été identifiées par crible double-hybride, en utilisant la portion amino-terminale du coiled-coil de la CLIP-115 comme appât (résidus 287 à 591, (Akhmanova *et al.*, 2001)). Ce domaine correspond également à une séquence présente, quoique non identique, au sein de la CLIP-170. Les quatre protéines identifiées à ce jour comme CLASPs (CLASP1 $\alpha$  et CLASP2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) présentent un domaine carboxy-terminal commun, responsable de l'interaction avec la CLIP-115 et -170, mais divergent de par la composition de leur domaine amino-terminal.

CLASP1 $\alpha$  et CLASP2 $\alpha$  sont deux protéines de 170 KDa, dont le domaine amino-terminal est homologue aux répétitions portées par la famille dis1/TOG, connue pour son rôle

de stabilisation des MTs, notamment en mitose (Inoue *et al.*, 2000; Lemos *et al.*, 2000). CLASP2 $\beta$  possède un domaine amino-terminal plus court, porteur d'un motif de palmitoylation, nécessaire et suffisant pour son adressage sur l'appareil de Golgi. Ce variant de CLASP2 de 140 KDa est une isoforme exprimée spécifiquement dans le cerveau. L'isoforme CLASP2 $\gamma$  est elle aussi une forme courte de CLASP2 (140 KDa) mais ubiquitaire. L'ensemble des CLASPs dispose sur leur versant carboxy-terminal d'un domaine d'interaction avec la CLIP -170/-115. La délétion de ce domaine n'abolit pas leur interaction avec les MTs tant *in vitro* qu'*in vivo* : les CLASPs sont capables d'interagir avec les MTs, indépendamment de leur liaison aux CLIPs. Les auteurs n'ont pu détecter de tubulines dans les produits d'immunoprécipitation réalisés avec les anticorps anti-CLAPs : ces protéines n'interagissent donc qu'avec une forme polymérisée de tubulines. Par ailleurs, cette interaction avec les MTs semble régulée: la déphosphorylation des CLASPs par l'apyrase augmente leur affinité pour les MTs.

Néanmoins, il apparaît dans les cellules 3T3 induites à migrer que les CLASPs se distribuent préférentiellement à l'extrémité des MTs stables, détyrosinés, faisant face au front de migration ("leading edge") de la cellule. Leur surexpression provoque leur relocalisation sur toute la longueur des MTs, où elles se codistribuent avec la CLIP-170. Les CLASPs pourraient être impliquées dans cette stabilisation des MTs: la microinjection d'anticorps dirigés contre CLASP2 dans les cellules 3T3 provoque une diminution de la proportion de MTs détyrosinés et une désorganisation du réseau microtubulaire. Cette stabilisation *via* CLASPs semble répondre à une signalisation cellulaire puisque ces protéines ne se redistribuent sur ces MTs et ne les stabilisent qu'en présence de facteurs sériques. Les auteurs mettent en avant une signalisation médiée par la PI3 kinase dont l'inhibition empêche la stabilisation des MTs. Cette signalisation est inhibée par la glycogène synthase kinase.

*In vivo*, l'équipe de Niels Galjart met en évidence une localisation des CLAPs aux bouts (+) des MTs. Cette localisation est dynamique, ressemblant à celle de la CLIP-170. Les CLASPs constituent ainsi de nouveaux membres de la famille des +TIPs.

**d) +TIPs : pour quoi faire ? Quels liens entre +TIPs ?**

L'instabilité dynamique est un moyen pour les MTs d'explorer l'espace intracellulaire à la recherche d'ancres corticales. Suite au contact MT/cortex sur des sites spécifiques, les MTs peuvent être stabilisés, permettant ainsi l'établissement d'une polarité cellulaire, à l'origine entre autre d'un transport MT dépendant vectorisé. Cette stabilisation spécifique implique une

régulation fine et régionalisée des MTs. Comme nous venons de le voir, les +TIPs sont des protéines suivant de manière spécifique l'extrémité (+) des MTs en cours de polymérisation. Pour la plupart, elles possèdent une fonction de modulation de l'instabilité dynamique des MTs *in vivo*. Toutes visent à stabiliser les MTs en cours de pousse, soit en agissant en tant que facteur anti-catastrophe, promoteur de polymérisation ou de sauvetage. L'émergence de ce groupe de protéines est à l'origine du concept de "complexe des bouts (+)" (pour revues, voir (Allan et Nathke, 2001; Sawin, 2000; Schroer, 2001; Schuyler et Pellman, 2001a)), qui pourrait constituer des cibles privilégiées d'une régulation visant à établir cette polarisation cellulaire. Nous allons maintenant donner deux exemples de l'implication des +TIPs dans l'établissement d'une polarité cellulaire.

*(1) Orientation du fuseau de division chez S. cerevisiae :*

Chez la levure bourgeonnante, l'emplacement du site de division cellulaire est spécifié par l'emplacement du futur bourgeon. Le fuseau de division subit plusieurs translations afin de se positionner au niveau de l'encolure du bourgeon ("bud neck") où aura lieu la ségrégation des chromosomes entre la cellule mère et la cellule fille (pour revues, voir (Gundersen, 2002a; Heil-Chapdelaine *et al.*, 1999; Schuyler et Pellman, 2001b; Segal et Bloom, 2001)).

***Mécanisme d'orientation 'précoce', positionnement du noyau :***

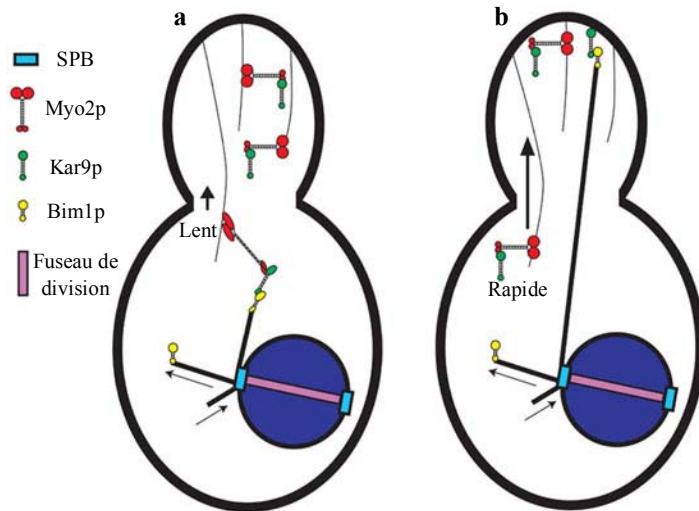
Bim1p et Bik1p, respectivement les orthologues de EB1 et CLIP-170 chez *S. Cerevisiae* assurent la haute dynamique des MTs, caractéristique de la phase G1 chez la levure bourgeonnante (Berlin *et al.*, 1990; Schwartz *et al.*, 1997). En se localisant aux bouts (+) des MTs, elles assurent le mécanisme de recherche et capture de sites d'arrimage corticaux. Ces derniers, en interagissant avec les MTs, permettront d'orienter le noyau en direction du bourgeon naissant. Une double délétion  $\Delta bik1 \Delta bim1$  est létale pour la levure, indiquant que BIK1 et BIM1 agissent dans deux voies différentes et essentielles de stabilisation des MTs (Schwartz *et al.*, 1997). KAR9 a été identifié comme un mutant de caryogamie. Les mutations de KAR9 sont à l'origine de défauts de migration du noyau et d'orientation des MTs (Kurihara *et al.*, 1994; Miller et Rose, 1998). La délétion de KAR9, combinée à une délétion d'une sous-unité du complexe D/D est létale pour la levure, indiquant que KAR9 et D/D font partie de deux voies fonctionnelles distinctes essentielles pour la cellule. Kar9p et Bim1p interagissent directement (Miller *et al.*, 2000). Bien que ne présentant qu'une faible homologie avec APC, le partenaire chez le mammifère d'EB1, certains auteurs parlent de KAR9 comme l'homologue fonctionnel d'APC chez *S. Cerevisiae* (Bienz, 2001; Korinek *et al.*, 2000; Lee *et*

*al.*, 2000). Pour cela, les auteurs se basent sur la forte homologie existant entre la portion de Kar9p responsable de l'interaction avec Bim1p et la séquence correspondante d'APC impliquée dans la liaison à EB1. Kar9p peut être conçue comme un marqueur de polarité cellulaire chez la levure bourgeonnante. Elle se localise spécifiquement au cortex du bourgeon naissant (Miller et Rose, 1998). Sa localisation est directement dépendante de l'intégrité du réseau de microfilaments d'actine (MFA). Bni1p est capable d'induire la formation de câbles d'actine en direction du bourgeon naissant (Miller *et al.*, 1999). Ces derniers sont le support de l'adressage de Kar9p au cortex du bourgeon. En effet, il a été démontré un transport vectorisé de Kar9p le long du cytosquelette d'actine. Ce transport est effectué au moyen d'une myosine de type V, myo2p (Beach *et al.*, 2000). Kar9p et Myo2p sont capables d'interagir tant *in vitro* qu'*in vivo*. La délétion de la queue carboxy-terminale de Myo2p ainsi que certaines mutations affectant ce domaine abolissent la localisation de Kar9p (Yin *et al.*, 2000). Elles entraînent également un défaut de positionnement du noyau qui ne peut s'orienter dans l'axe cellule mère/cellule fille, pour se localiser à l'encolure du bourgeon. La caractérisation des doubles mutants obtenus en combinant la délétion des gènes BIM1, KAR9 et MYO2 révèle un phénotype comparable à ceux des simples mutants : les protéines résultantes agissent donc dans une même voie fonctionnelle.

L'ensemble de ces données est à l'origine de l'émergence de deux modèles visant à établir la contribution relative de chacun des acteurs moléculaires au mécanisme de positionnement du noyau à l'encolure du bourgeon.

Le premier propose que Myo2p assure la force de traction exercée sur le noyau et qui l'amène au niveau de l'encolure du bourgeon (**figure 12a**). Kar9p serait transporté par Myo2p le long des câbles d'actine dont la polymérisation est réglée par Bni1p (Yin *et al.*, 2000). Les MTs polymérisant à partir du SPB, ancrés au noyau, portent à leur extrémité (+) Bim1p. L'interaction Bim1p/Kar9p permettrait l'ancrage des bouts (+) des MTs sur les microfilaments d'actine. Le gradient de Kar9p transporté par Myo2p assurerait une capture et un guidage des MTs en direction du bourgeon. Les MTs étant ancrés au SPB par leur bout (-), le noyau subirait indirectement la force de traction exercée par Myo2p. Deux arguments fragilisent ce modèle. Le premier, est l'absence de détection d'un complexe tripartite Myo2p/Kar9p/Bim1p. En effet, le seul complexe isolé contenant Kar9p et Bim1p a une masse moléculaire de 250 KDa, incompatible avec la présence en son sein de la myosine (Lee *et al.*, 2000). Néanmoins, on pourrait penser que la formation du complexe est régulée et transitoire. Le second argument tient à la physiologie du phénomène. *In vivo*, la vitesse de déplacement du noyau est

incompatible avec un transport myosine dépendent puisque 50 fois plus véloce (Beach *et al.*, 2000). Ce mode de fonctionnement proposé est peu probable, mais pourrait néanmoins avoir une participation minoritaire dans le phénomène de positionnement précoce du noyau.



**Figure 12 :**

Deux modèles d'implication du trio Myo2p/Kar9p/Bim1p dans le positionnement du noyau chez *S. Cerevisiae*.

a-Les MTs cytoplasmiques (traits épais) glissent le long des câbles d'actine (traits fins) : le moteur Myo2p prend en charge le mouvement, Bim1p sert de signal de reconnaissance au bout (+) des MTs, tandis que Kar9p assure le lien entre les deux.

b-Ce modèle séquentiel propose une première étape de transport et d'ancrage de Kar9p au cortex du bourgeon *via* Myo2p. Les MTs cytoplasmiques pénètrent le bourgeon, chargés de Bim1p à leur bout (+). L'interaction Bim1p/Kar9p assure l'ancrage dynamique du MT au cortex, tandis qu'il est dépolymérisé, permettant ainsi d'effectuer une traction sur le noyau.

D'après (Schuyler et Pellman, 2001b).

Le second modèle propose une intervention séquentielle des acteurs moléculaires (**figure 12b**). Myo2p conduit Kar9p jusqu'au cortex du bourgeon, le long des câbles d'actine (Schuyler et Pellman, 2001b). Kar9p, associée à l'actine corticale, constitue alors un point d'ancrage des MTs au cortex du bourgeon. Les MTs pénétrant dans le bourgeon et chargés de Bim1p à leur extrémité (+) interagissent avec son cortex. Cette interaction MTs/cortex est stabilisée par l'association Bim1p/Kar9p qui, par ailleurs induit leur dépolymérisation. L'association de l'ancrage cortical des MTs et de leur dépolymérisation concomitante assure la traction du noyau vers l'encolure du bourgeon. Dans cette configuration, les acteurs moléculaires responsables de la dépolymérisation et de la signalisation l'induisant restent à identifier.

### **Mécanisme d'orientation 'tardif', orientation du fuseau de division :**

Après duplication du SPB mère, le noyau de la levure bourgeonnante est dans une position proche de l'encolure du bourgeon. Le fuseau de division se met en place à l'intérieur du noyau. Il s'oriente progressivement dans l'axe cellule mère-cellule fille grâce à un mécanisme impliquant les MTs cytoplasmiques. Ceux émanant du SPB fille s'associent latéralement et glissent le long du cortex du bourgeon (Adames et Cooper, 2000). La tension

exercée par l'interaction cortex/MTs amène progressivement le noyau à pénétrer dans l'encolure du bourgeon où aura lieu la ségrégation des chromosomes.

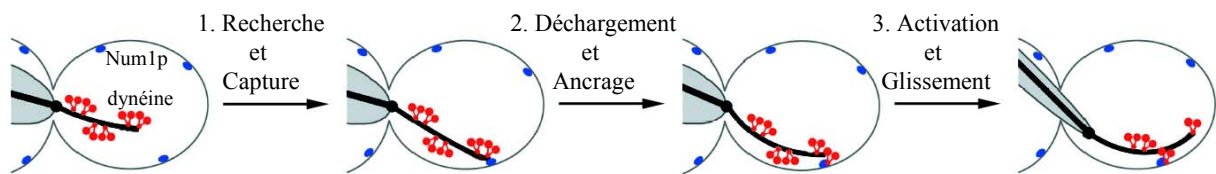
Ce mécanisme met en jeu la chaîne lourde du moteur moléculaire MT-dépendant dynéine, Dyn1p. La disruption du gène DYN1 provoque un défaut de localisation du noyau, qui demeure dans la cellule mère (Eshel *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1993). Néanmoins, l'absence de Dyn1p ne provoque pas de phénotype visible sur l'assemblage du fuseau, son élongation ou encore la ségrégation des chromosomes. Des phénotypes comparables sont observés chez les mutants du complexe dynactine, constitué par les produit des gènes JNM1 (orthologue de la p50/dynamitine, (McMillan et Tatchell, 1994)), NIP100 (orthologue de p150<sup>Glued</sup>, (Kahana *et al.*, 1998)) et ACT5 (orthologue de Arp1, (Muhua *et al.*, 1994)).

L'utilisation d'une chimère GFP-Tub3p a permis de visualiser par vidéomicroscopie l'insertion et le comportement des MTs cytoplasmiques dans le bourgeon. Ces derniers pénètrent dans le bourgeon où ils s'incurvent le long du cortex. La longueur du MT étant inchangée, il apparaît que le MT est tiré vers le bourgeon, entraînant le noyau vers son encolure (Carminati et Stearns, 1997). Les mêmes auteurs ont montré que dans le cadre d'une souche délétée pour DYN1, les MTs cytoplasmiques sont plus longs comparés à ceux de la souche sauvage. Les MTs pénétrant dans le bourgeon courent le long du cortex, sans toutefois trouver de point d'ancrage : le noyau ne subit aucune traction. Ces résultats sous tendent l'existence d'un point d'ancrage du complexe D/D au cortex. La localisation de Dyn1p par immunochimie, quoique sujette à caution, suggère d'ailleurs une localisation corticale de Dyn1p (Yeh *et al.*, 1995).

Num1p (nuclear migration 1) se localise au cortex cellulaire (Farkasovsky et Kuntzel, 1995) de manière D/D indépendante (Heil-Chapdelaine *et al.*, 2000). Le mécanisme d'orientation 'tardif' du fuseau de division dépend de Num1p, comme montré par délétion du gène correspondant. Les approches génétiques (Geiser *et al.*, 1997) et biochimiques (Farkasovsky et Kuntzel, 2001) entreprises placent Num1p dans la voie fonctionnelle D/D. Num1p semble à ce jour le meilleur candidat en tant que récepteur du complexe D/D au cortex (pour revue, voir (Bloom, 2001)).

L'ensemble de ces données ont conduit à établir un modèle impliquant Num1p et le complexe D/D dans l'orientation 'tardive' du fuseau de division (**figure 13**). Grâce à l'instabilité dynamique, les MTs cytoplasmiques prospectent l'espace du bourgeon à la recherche de sites d'ancrage corticaux contenant Num1p. Le complexe D/D est alors localisé aux bouts (+) des MTs. L'interaction D/D-Num1p ancre provisoirement le MT au cortex.

L'association MT/cortex est dite "end-on" : le MT semble se terminer sur le cortex. Le complexe D/D est déposé au cortex, ancré par Num1p et activé. Le moteur devenu cortical se déplace en direction du bout (-) du MT : il en résulte un déplacement net du MT vers l'extrémité du bourgeon. La conséquence est une traction qui s'exerce sur le noyau, lui permettant de se placer dans l'encolure du bourgeon.



**Figure 13 :**

Modèle d'implication du complexe dynéine/dynactine et de Num1p dans l'orientation du fuseau chez *S. Cerevisiae*.

Le MT cytoplasmique chargé à son bout (+) du complexe D/D parcourt le bourgeon à la recherche d'un point d'ancrage cortical (1). L'interaction D/D-Num1p permet de lier transitoirement le MT au cortex et de charger le complexe D/D sur son récepteur cortical (2). Le moteur activé se déplace en direction de l'extrémité (-) du MT, générant une force de traction sur le noyau (3). Le MT glisse le long du cortex, tandis que le noyau et le fuseau de division qu'il contient sont tirés à travers l'encolure du bourgeon.

Adapté de (Lee *et al.*, 2003).

### (2) Acquisition et maintien d'une polarité cellulaire :

Le migration cellulaire implique le remaniement dynamique d'au moins deux éléments du cytosquelette : le réseau microtubulaire et celui constitué par les microfilaments d'actine. Au cours de la migration, la cellule établit une polarité. Celle-ci conduit à la formation d'un large lamellipode, dont la membrane constitue le front de migration ("leading edge"), en arrière duquel se forme une structure contractile rétractile, le filopode. L'actine est polymérisée dans la zone immédiatement adjacente à la membrane du front de migration. Les microfilaments y sont organisés sous la forme d'un enchevêtrement dense de câbles d'actine. La croissance continue de ce réseau pousse la membrane du "leading edge", ayant pour conséquence l'avancée de cette structure dans le sens de la migration. Elle permet également un recyclage de sous-unités d'actine par la dépolymérisation des microfilaments en arrière de la structure (Wang, 1985; Waterman-Storer et Salmon, 1999). A mesure que l'on s'éloigne du lamellipode en direction du filopode, les câbles d'actine s'organisent en faisceaux par association latérale. Cette particularité des microfilaments situés en arrière de la cellule migrante est due à l'activation locale de myosines ayant pour effet une contraction des câbles d'actine (Cramer *et al.*, 1997; Small *et al.*, 1998).



***Asymétrie structurale et petites protéines G :***

L'asymétrie de distribution de l'actine semble suffisante pour générer cette motilité. Ce point a été démontré en utilisant un système original : le système des cytoplastes ou fragments discoïdes (Verkhovsky *et al.*, 1999). Il s'agit de produits de l'énucléation de fibroblastes. Sans stimulation externe, ils adhèrent au substrat, présentant une forme discoïde, leur actine adoptant une distribution isotrope. Sous l'effet d'une pression exercée par micromanipulation, le cytoplaste va se polariser : la zone stimulée se contracte, tandis que le bord opposé s'étend. Le fragment discoïde entreprend alors un déplacement. Dans le cadre de cellules "entières" ce gradient se met en place sous l'effet de protéines de signalisation. Ces dernières appartiennent aux petites GTPases (ou petite protéine G) de la famille Rho (pour revue, voir (Kaibuchi, 1999)). Ces protéines agissent comme de véritables "interrupteurs" moléculaires. Les protéines de la famille Rho cyclent entre deux formes. L'une active, est liée au GTP tandis que la seconde inactive, est liée au GDP. L'activité GTPasique est induite par la famille des GAP (GTPase-activating proteins) tandis que l'échange de nucléotides (GDP→GTP) est assuré par les GEF (guanine-nucleotide-exchange factors). Rac1 est une petite protéine G dont l'activation promeut la nucléation et la réticulation de l'actine. Le lamellipode renferme un réseau hautement réticulé d'actine, dont la mise en place dépend de Arp2/3, une cible de Rac1 (pour revue, voir (Pollard *et al.*, 2000; Vale, 2003)). Son inhibition empêche l'extension du lamellipode et inhibe la migration cellulaire (Allen *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1998; Nobes et Hall, 1999). Rho a été montré comme une GTPase capitale pour la contraction du corps cellulaire, en arrière du lamellipode (Allen *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1998). Rho agit indirectement *via* ROCKs (Rho-kinases) sur l'état de phosphorylation de la chaîne légère des myosines (MLC) : elle inhibe la phosphatase de MLC et la phosphoryle, l'activant (Amano *et al.*, 2000). Rho a également pour cible mDia, une protéine induisant la formation de fibres de stress (Watanabe *et al.*, 1997). La MLC ainsi activée promeut la contraction des câbles d'actine. Un modèle simple expliquant la polarisation consisterait à considérer que Rac1 est actif dans le lamellipode (Kraynov *et al.*, 2000), alors que Rho est actif dans le corps cellulaire.

Dans cette polarisation du fibroblaste, quelle est la contribution des MTs ? L'utilisation de drogues affectant la dynamique des MTs a permis de déterminer que le cytosquelette de tubulines est requis pour le maintien de la polarité cellulaire (Bershadsky *et al.*, 1991; Vasiliev *et al.*, 1970). Les auteurs montrent que les MTs sont impliqués dans la restriction de l'activité du lamellipode à une seule zone de la cellule. D'autre part, la dépolymérisation des

MTs conduit à une contraction des faisceaux d'actine, tandis que leur stabilisation participe à la formation du lamellipode, en activant respectivement Rho ou Rac1 (Waterman-Storer *et al.*, 1999).

### ***Réorientation du MTOC :***

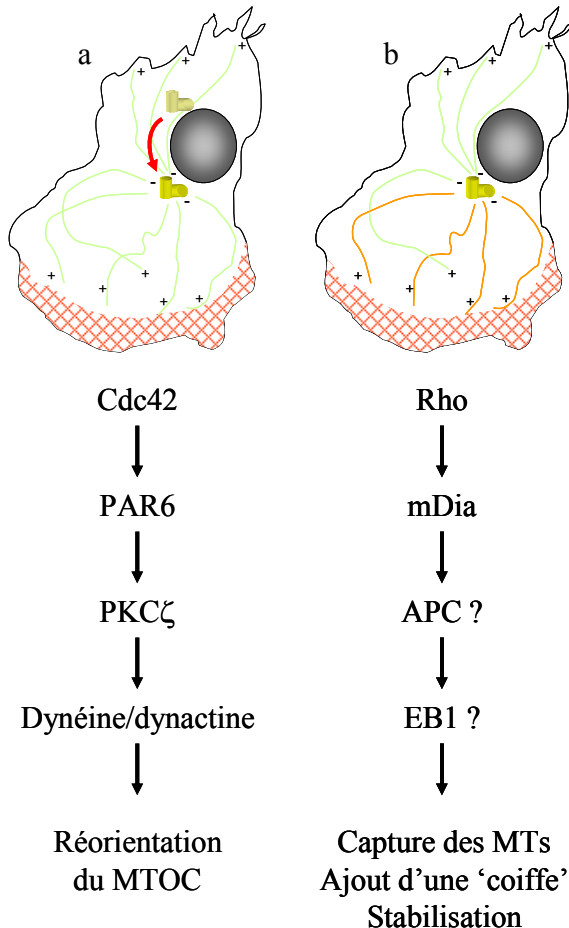
L'une des étapes précoces de la migration met en jeu une réorientation du centre organisateur des MTs. Ce phénomène a été bien documenté (Gotlieb *et al.*, 1981; Gundersen et Bulinski, 1988), mais les mécanismes qui le sous-tendent n'ont été étudiés que récemment. Dans une situation expérimentale où une blessure est réalisée sur un tapis cellulaire à confluence ("wound healing"), toute cellule faisant face à la blessure change de forme. En présence de facteurs sériques, le MTOC se réoriente pour se placer face au "leading edge", en avant du noyau. L'appareil de Golgi est également repositionné pour faire face au front de migration. Enfin, les MTs polymérisés par le MTOC à destination du lamellipode sont stabilisés (pour revue, voir (Gundersen, 2002a)). Parmi les facteurs sériques, le seul acide lysophosphatidique (LPA) est capable de promouvoir la réorientation du MTOC (Palazzo *et al.*, 2001a). Le LPA seul induit la formation de la forme liée au GTP de Rho (Ren *et al.*, 1999) tandis qu'au sein d'une cellule ayant établi des contacts avec le substrat, il peut également promouvoir la formation de Cdc42-GTP (Sander *et al.*, 1998). L'utilisation de dominant-négatifs de Rho, Rac1 et Cdc42 ou de constructions codant pour des versions constitutivement actives de ces petites protéines G a permis de mettre en évidence que seule Cdc42 active est nécessaire et suffisante pour réaliser la réorientation du MTOC. D'autre part, ces méthodes ont permis de mettre en avant l'indépendance entre la relocalisation du MTOC et la stabilisation des MTs du "leading edge". Ce dernier mécanisme, ainsi que la formation de fibres d'actine dites "de stress" dépendent de Rho. Il est d'ailleurs à noter que ces mouvements du MTOC sont indépendants du cytosquelette d'actine, comme cela a été démontré en utilisant la cytochalasine D, une drogue dépolymérisant les MFA. Nous avons vu précédemment l'implication du complexe D/D dans le guidage du SPB vers l'encolure du bourgeon chez *S. cerevisiae* : les auteurs ont donc naturellement cherché à tester l'implication de ce moteur dans la réorientation du MTOC. Deux méthodes permettent de rompre l'intégrité du complexe D/D : la surexpression d'une sous-unité du complexe dynactine, la p50/dynamitine, et la micro-injection d'anticorps dirigés contre la chaîne légère de la dynéine cytoplasmique. L'emploi de ces deux agents abolit la réorientation du MTOC, impliquant le complexe D/D dans ce mécanisme (Palazzo *et al.*, 2001a). La voie de transduction liant Cdc42 au complexe D/D reste néanmoins à définir. Les travaux récents de l'équipe d'Alan Hall menés sur des

astrocytes de rat induit à migrer impliquent un intermédiaire dans la voie Cdc42/dynéine/dynactine (Etienne-Manneville et Hall, 2001). Il s'agit de PAR6 (partitioning-defective protein 6), un effecteur de Cdc42. PAR6 est capable de s'associer à la forme active de Cdc42. C'est dans cette configuration qu'elle recrute la protéine kinase C atypique PKC $\zeta$  (pour revue, voir (Etienne-Manneville et Hall, 2003)). L'activation du complexe tripartite dépend de l'adhérence cellulaire médiée par les intégrines. L'interaction PAR6/PKC $\zeta$  est requise pour la réorientation D/D dépendante du MTOC (**figure 14a**). Le mode d'action de Cdc42/PAR6/PKC $\zeta$  reste à élucider.

#### ***Stabilisation des microtubules vers le lamellipode :***

De manière concomitante à la réorientation du MTOC, les MTs polymérisant en direction du front de migration sont stabilisés par un mécanisme impliquant la mise en place d'une coiffe ("capping") à leur extrémité la plus dynamique (Infante *et al.*, 2000). Le capping se manifeste par une absence d'incorporation/détachement de sous unités de tubulines au bout (+) des MTs. Ce phénomène stabilise les MTs pour des durées supérieures une heure. Les modifications post-traductionnelles telles que la détyrosination caractérisent ces MTs. L'activation de la voie Rho est nécessaire et suffisante à l'établissement et à l'orientation de tels MTs (Cook *et al.*, 1998; Gundersen *et al.*, 1994; Nagasaki et Gundersen, 1996). L'utilisation de mutants de Rho déficients pour la liaison spécifique à certains de ses effecteurs a permis de souligner le rôle de l'un d'eux, mDia comme promoteur de la stabilisation des MTs (Palazzo *et al.*, 2001b). mDia est un membre de la famille DRF (diaphanous-related formins) dont l'orthologue chez la drosophile est impliqué dans le mécanisme de cytokinèse (Castrillon et Wasserman, 1994). Son orthologue chez *S. cerevisiae* n'est autre que BNI1, déjà rencontré pour son implication dans le positionnement du noyau à proximité du bourgeon. L'expression d'une forme dépourvue du domaine de liaison à Rho de mDia1 ou mDia2 dans les cellules murines 3T3 suffit à obtenir des MTs stables, détyrosinés. Cette stabilisation implique la formation d'une coiffe aux extrémités (+) des MTs, puisque ceux-ci sont incapables de relarguer/incorporer de nouveaux dimères de tubulines (Palazzo *et al.*, 2001b). En revanche, dans le cadre d'une expérience de "wound healing", les MTs stabilisés ne sont pas orientés vers le front de migration. APC a été localisée au "leading edge" des cellules MDCK en cours de migration (Nathke *et al.*, 1996). APC étant un lointain orthologue de Kar9p, de nombreux auteurs ont postulé son implication dans la capture des MTs par le cortex. En effet, sa position privilégiée au cortex permettrait aux MTs porteurs de la +TIP EB1 de trouver un ancrage périphérique dont la conséquence serait la stabilisation du

MT. Par ailleurs, il semblerait que l'expression d'APC dans les fibroblastes 3T3 induise une stabilisation des MTs (Palazzo *et al.*, 2001b). Bien que séduisante puisque offrant un parallèle avec les mécanismes observés chez la levure bourgeonnante, l'implication du couple EB1/APC reste néanmoins à démontrer (**figure 14b**).



**Figure 14 :**

Voies de signalisation impliquées dans la réorientation du MTOC et la stabilisation des MTs dans le lamellipode.

a- Lorsque la motilité du fibroblaste est initiée, Cdc42 activé lie PAR6 qui à son tour s'associe avec la PKCζ. Le résultat de cette cascade de signalisation est une réorientation du MTOC (indiquée par la flèche) en regard du "leading edge" par un mécanisme impliquant le complexe moteur dynéine/dynactine.

b- L'activation de Rho par les facteurs sériques (LPA) provoque celle de mDia. Les étapes de transduction du signal suivantes n'ont pas encore été élucidées mais pourraient impliquer une interaction des MTs avec APC au cortex du lamellipode. La capture des MTs provoque leur stabilisation (MTs oranges sur le schéma) par ajout d'une coiffe à leur bout (+).

Adapté de (Gundersen, 2002a).

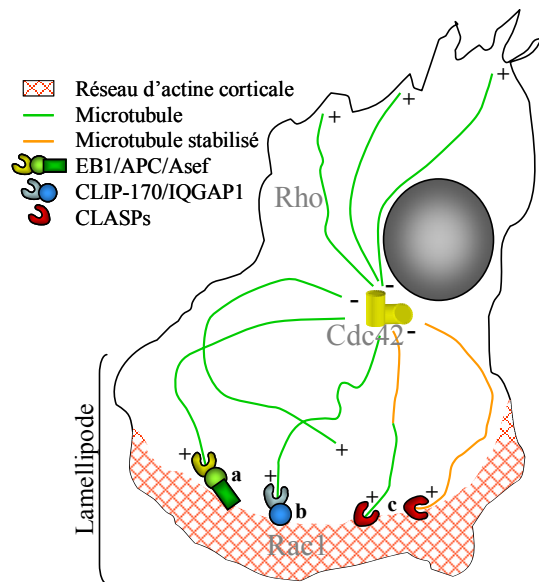
#### **+TIPs et transduction du signal :**

Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer la contribution des bouts (+) des MTs à la polarisation du fibroblaste motile. La première suppose que les MTs organisent un transport vectorisé d'organites et membranes à destination du lamellipode en assurant *via* leur extrémité (+) un ancrage au cortex. Le transport vésiculaire est requis pour l'extension de la membrane du "leading edge". La vectorisation serait rendu possible grâce aux kinésines qui, par ailleurs, montrent une affinité accrue pour les MTs détyrosinés (Liao et Gundersen, 1998). La seconde hypothèse propose que les MTs soient les éléments responsables de l'activation régionalisée de petites protéines G (pour revue, voir (Wittmann et Hyman, 1999)). Bien qu'une interaction ait été détectée entre Rac1 et les tubulines par "blot overlay" (Best *et al.*, 1996), ni Rac1 ni Rho ne colocalisent avec les MTs *in vivo* (Michaelson *et al.*, 2001). Les

+TIPs, de par leur localisation aux bouts (+) des MTs sont les candidates idéales comme activateurs potentiels des petites protéines G. Plus exactement, c'est du côté de leurs partenaires qu'il faut chercher un moyen pour les MTs de réguler la polarité de l'actine (pour revue, voir (Gundersen, 2002b)).

Une interaction a pu être démontrée entre APC et Asef, une GEF spécifique de Rac1 (Kawasaki *et al.*, 2000). La localisation d'APC au bout (+) des MTs au sein des domaines membranaires en cours d'extension constitue un argument supplémentaire en faveur d'une activation locale de Rac1 par les MTs APC positifs (Mimori-Kiyosue *et al.*, 2000a; Nathke *et al.*, 1996). Néanmoins Asef n'a pu être localisée aux bouts (+) des MTs *in vivo*. La première étape de polarisation cellulaire subie par le fibroblaste en cours de migration pourrait être le fruit d'une activation locale de Rac1 par Asef, au moyen de MTs porteurs du complexe EB1/APC. L'implication des +TIPs dans ce mécanisme ne se limite pas à ce complexe. En effet, une étude récente montre que la CLIP-170 est présente au sein de deux types de complexes tripartites : CLIP-170/IQGAP1/Rac1 et CLIP-170/IQGAP1/cdc42 (Fukata *et al.*, 2002). IQGAP1 est un effecteur de Rac1 et cdc42, qui s'accumule au "leading edge" où il promeut la réticulation de l'actine (Hart *et al.*, 1996; Kuroda *et al.*, 1996). Elle est capable de se lier indirectement aux MTs *via* son domaine d'interaction avec la CLIP-170, situé dans la partie carboxy-terminale d'IQGAP1 (Fukata *et al.*, 2002). Le domaine d'interaction de CLIP-170 avec IQGAP1 s'étend sur la totalité de ses deux CAP-Gly, et se poursuit sur le domaine riche en sérines adjacent. Sa liaison aux MTs étant maintenue même lorsqu'elle interagit avec IQGAP1, il semblerait que le domaine cible de la CLIP-170 soit situé en dehors des deux motifs CAP-Gly. Il est intéressant de noter qu'IQGAP1 n'interagit qu'avec les formes activées de Rac1 et cdc42. Si on considère que la CLIP-170 localise IQGAP1 aux bouts (+) des MTs, ces derniers pourraient être ancré au "leading edge" *via* une interaction entre Rac1 et IQGAP1. D'autre part, il est à noter que la formation du trio CLIP-170/IQGAP1/Rac1 renforce l'association d'IQGAP1 avec les MTs : la formation du complexe tripartite pourrait être un moyen de réaliser un lien solide entre le réseau microtubulaire et le cortex d'actine au sein du lamellipode. De manière comparable, le couple CLIP-170/IQGAP1 est capturé par cdc42 active au niveau du filopode : l'interaction CLIP-170/IQGAP1 semble impliquée dans la formation de l'axe de polarisation "antérieur/postérieur" du fibroblaste en cours de migration. Cette implication de la CLIP-170 dans la génération de l'axe cellulaire n'est pas sans rappeler celui de Tip1p chez *S. pombe* (pour revue, voir (Brunner, 2002)). Le lien MT/cortex pourrait également être réalisé au moyen d'autres +TIPs, comme le complexe D/D.

En effet, une interaction entre la chaîne intermédiaire de la dynéine (DIC) et la  $\beta$ -caténine a été mise en évidence, offrant un mécanisme supplémentaire d'ancrage des MTs au cortex de la cellule (Ligon *et al.*, 2001). Ce rôle de D/D avait d'ailleurs été postulé dans le cadre des cellules mitotiques (Busson *et al.*, 1998). Une telle stabilisation pourrait laisser le temps aux enzymes de modifications des tubulines de les détyrosiner et de les acétyler, comme constaté par immunocytochimie. L'action d'autres +TIPs comme les CLASPs pourrait contribuer à la formation de MTs stables dans le lamellipode (Akhmanova *et al.*, 2001). Le transport vectorisé décrit dans la première hypothèse pourrait alors avoir lieu. Bien que ce modèle (**figure 15**) puisse être attrayant, il reste néanmoins à démontrer l'existence d'une coopération de l'ensemble des +TIPs dans l'établissement de la polarité cellulaire du fibroblaste motile.



**Figure 15 :**

Modèle de coopération des +TIPs dans l'établissement de la polarité d'une cellule motile.

Rac1 se localise dans le lamellipode. Une fois activé par Asef, amené par EB1/APC lié aux MTs (a), il induit la formation d'un réseau de câbles d'actine. Rac1 activé permet également l'ancrage de bouts (+) de MTs porteurs de la CLIP-170 liée à IQGAP1, l'un de ses effecteurs (b). La formation du trio CLIP/IQGAP1/Rac1 augmente l'affinité de la CLIP-170 pour le MT, maintenant le lien MT/cortex. La stabilisation du MT est induite par modification post-traductionnelle des tubulines et par la présence des CLASPs (c).

Adapté de (Wittmann et Waterman-Storer, 2001).

### C. CLIP-170 : un rôle dans le trafic intracellulaire ?

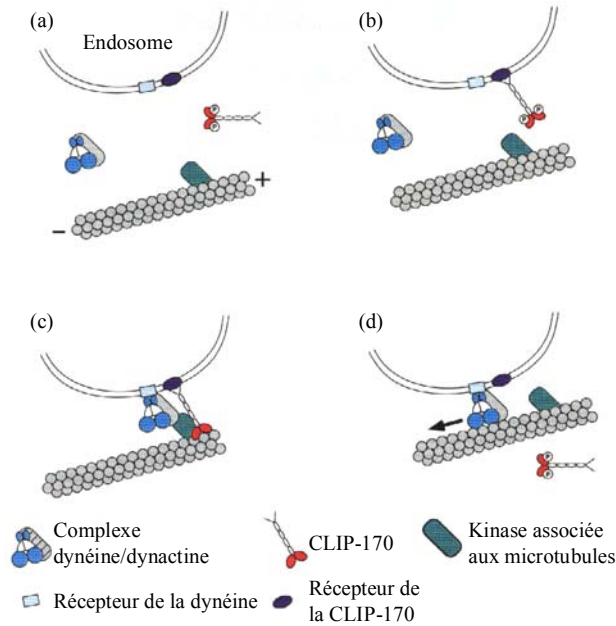
La CLIP-170 a été identifiée par l'équipe de Thomas Kreis comme une protéine pouvant lier les MTs de manière régulée (Rickard et Kreis, 1990). La phosphorylation de résidus sérines encadrant ses deux CAP-Gly provoquent le détachement des MTs *in vitro* (Rickard et Kreis, 1991). Comme nous l'avons vu, ce schéma simple de régulation semble être plus complexe *in vivo* puisque FRAP/mTOR, une kinase dont l'une des cibles n'est autre que la CLIP-170, augmente son affinité pour les MTs (Choi *et al.*, 2002). Les investigations menées sur la CLIP-170 ont révélé qu'elle est capable d'établir une liaison statique entre des MTs polymérisés *in vitro* et des vésicules d'endocytose (Pierre *et al.*, 1992). Dans un système reconstitué contenant des vésicules d'endocytose, des MTs stabilisés et du cytosol, la déplétion engendrée par un anticorps dirigé contre la CLIP-170 diminue l'association

membranes/MTs. Les preuves d'une telle fonction *in vivo* ne reposent actuellement que sur la co-localisation partielle entre les vésicules positives pour le récepteur à la transferrine et la CLIP-170 (Pierre *et al.*, 1992). Néanmoins, sa localisation dynamique aux bouts (+) des MTs polymérisant (Perez *et al.*, 1999) en font la candidate idéale du processus de recherche et capture des vésicules d'endocytose.

### **1. Modèle fonctionnel :**

Suite à leur capture, les vésicules d'endocytose subissent un transport rétrograde (i.e. en direction de l'extrémité (-) des MTs) MT-dépendant. Ce transport implique le recrutement et l'activation du complexe moteur D/D (Lacey et Haimo, 1992; Paschal et Vallee, 1987; Schnapp et Reese, 1989; Schroer *et al.*, 1989). Compte tenu de la co-localisation de la CLIP-170 avec le complexe D/D sur les vésicules d'endocytose (Lacey et Haimo, 1992), un modèle simple (**figure 16**) a été proposé permettant d'illustrer la contribution des CLIPs aux mouvements d'organites (Rickard et Kreis, 1996).

D'après les premières données dont les auteurs disposaient en 1996, la CLIP-170 est hyperphosphorylée lorsqu'elle n'est pas associée aux MTs (Rickard et Kreis, 1990; Rickard et Kreis, 1991). C'est sous cette forme qu'elle serait recrutée sur le cargo à déplacer, en l'occurrence un endosome. L'interaction CLIP-170/endosome serait médiée par un récepteur membranaire *via* le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170, démontré comme requis pour son adressage aux endomembranes (Pierre *et al.*, 1994). Cette association pourrait être rencontrée avant ou après l'interaction avec les MTs, qui nécessite par ailleurs la déphosphorylation préalable des domaines riches en sérines de la CLIP-170. Le complexe dynéine/dynactine interagirait alors avec son récepteur membranaire sur l'endosome. La liaison CLIP-170/MT place idéalement le moteur moléculaire à proximité du "rail" le long duquel il va initier le déplacement de la vésicule. Pour que le mouvement ait lieu, il faut que le complexe D/D soit activé et que le lien statique établi par la CLIP-170 soit levé. Une kinase associée aux MTs phosphorylerait la CLIP-170 sur ses domaines riches en sérines, abolissant son interaction avec les MTs. Le mouvement rétrograde D/D dépendant pourrait alors avoir lieu.



**Figure 16 :**

Rôle de la CLIP-170 dans la régulation de l'interaction organe/microtubule : modèle initial.

La CLIP-170 est présente dans le cytoplasme sous une forme hyperphosphorylée, incapable de se lier aux MTs (a). Elle est recrutée sur la membrane des endosomes à transporter *via* son extrémité carboxy-terminale sur un récepteur membranaire (b). La déphosphorylation de la CLIP-170 autorise son interaction avec les MTs. Le complexe moteur D/D interagit avec son récepteur membranaire. L'interaction CLIP-170/MTs place le complexe D/D dans une position idéale facilitant son association avec les MTs (c). La phosphorylation de la CLIP-170 par une kinase associée aux MTs lève l'interaction statique endosome/MT et permet au mouvement rétrograde D/D dépendant d'avoir lieu.

D'après (Rickard et Kreis, 1996).

Depuis la parution de ce modèle, les évidences d'un fonctionnement conjoint de la CLIP-170 avec le complexe D/D se sont accumulées. Chez la levure bourgeonnante, une double délétion  $\Delta BIK1 \Delta DYN1$  (orthologues des gènes codant respectivement pour la CLIP-170 et la chaîne lourde de la dynéine) n'engendre pas de phénotype additionnel, indiquant que les deux protéines sont impliquées dans une même voie fonctionnelles (Schwartz *et al.*, 1997). La CLIP-170 co-localise aux bouts (+) des MTs avec plusieurs sous-unités de la dynactine. L'équipe de Richard Vallee a mis en évidence une co-localisation entre la p50/dynamitine, la p150<sup>Glued</sup>, Arp1 et la CLIP-170. Cette distribution ne coïncide pas avec les MTs détyrosinés, indiquant que ces protéines ne présentent pas ou peu d'affinité pour les MTs stabilisés (Vaughan *et al.*, 1999). Les auteurs ont également mis en évidence une co-distribution de la chaîne intermédiaire de la dynéine aux bouts (+) des MTs, dans des conditions expérimentale qui demeurent critiquables. En effet, les cellules sont amenées à subir une variation de température avant fixation : de 37°C elle sont portées à température ambiante. On peut imaginer qu'une telle variation puisse ralentir l'hydrolyse de l'ATP par la chaîne lourde de la dynéine, nécessaire au mouvement D/D dépendant. Dans ce cas de figure, l'image observée résulterait d'une véritable tétanisation des vésicules aux bouts (+) des MTs. Ceci présuppose que la dynéine soit chargée sur les vésicules avant que le complexe n'interagisse avec la dynactine. Une fois de plus, un mécanisme de recherche/capture des vésicules par les MTs pourrait être envisagé : le complexe activateur associé aux bouts (+) des MTs explore le volume de la cellule à la recherche de vésicules chargées en dynéine. Dans cette hypothèse, la CLIP-170 ne serait pas indispensable puisque le mode d'association entre le moteur et son



activateur suffirait pour assurer la capture de la vésicule. Ce modèle a été évoqué par Kevin Vaughan qui met en évidence que certains MTs sont dépourvus de CLIP-170, mais une fois de plus, les conditions expérimentales utilisées incitent à la prudence dans l'interprétation de ses résultats (Vaughan *et al.*, 2002). En dépit de ces données, la CLIP-170 semble essentielle pour l'adressage de la p150<sup>Glued</sup> aux bouts (+) des MTs. Son adressage dépend du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 comme démontré en utilisant des formes tronquées de cette dernière (Valetti *et al.*, 1999). Nos résultats confirment ces données. De manière intéressante, la surexpression de la p50/dynamitine, qui rompt l'intégrité du complexe dynactine (Wittmann et Hyman, 1999), déplace la protéine Arp1 et la dynéine (dans les conditions controversées mentionnées plus haut) des bouts (+) des MTs (Vaughan *et al.*, 1999), la p150<sup>Glued</sup> y restant associée. Ces données semblent indiquer que l'association CLIP-170/dynactine pourrait avoir lieu *via* la p150<sup>Glued</sup> qui à son tour recruterait les autres sous-unités du complexe activateur et le moteur. A ce stade, il nous semble nécessaire de décrire les différents constituants du complexe moteur dynéine et de son activateur, la dynactine.

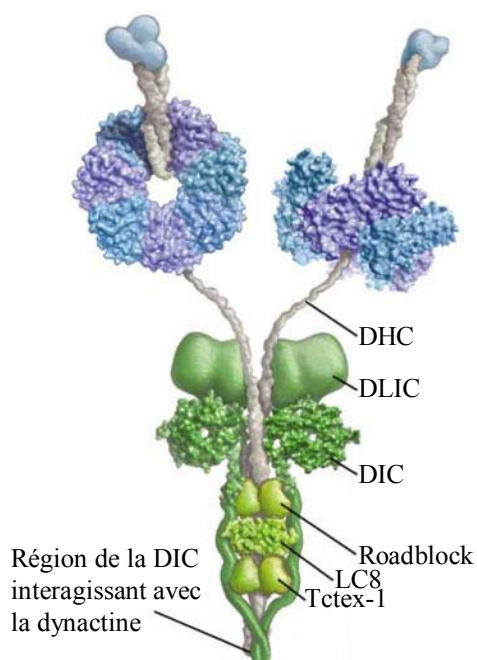
## **2. Le complexe moteur dynéine/dynactine :**

Le terme de dynéine (*dyne*: force et *-in*: protéine) a été utilisé pour la première fois en 1965, afin de nommer le complexe moléculaire à activité ATPasique, impliqué dans le battement des cils de *Tetrahymena pyriformis* (Gibbons et Rowe, 1965). Cette dynéine axonémale est le membre fondateur de la famille des dynéines qui compte un second membre, la dynéine cytoplasmique à laquelle nous allons à présent nous intéresser. La chaîne lourde de la dynéine cytoplasmique (DHC) a été initialement isolée comme une MAP, la MAP1C (Bloom *et al.*, 1984). Cette protéine, adsorbée sur un substrat approprié, est capable de déplacer seule des MTs *in vitro* (Paschal et Vallee, 1987), couplant le transport en direction de l'extrémité (-) des MTs à l'hydrolyse de l'ATP. Le terme de dynéine cytoplasmique définit le complexe moléculaire regroupant à la fois la MAP1C/DHC et les protéines associées, l'ensemble sédimentant à 20 S. En système reconstitué, l'addition de dynéine cytoplasmique seule à un mélange de vésicules et de MTs polymérisés permet l'ancrage des organites mais n'engendre qu'une faible motilité le long des MTs (Schroer *et al.*, 1989). Deux fractions cytosoliques sont capables de stimuler l'activité motrice de la dynéine cytoplasmique, renfermant chacune un complexe moléculaire dont les coefficients de sédimentation sont 9 et 20 S (Schroer et Sheetz, 1991). Le complexe 20 S a été le plus étudié : les auteurs l'ont nommé dynactine pour "dynein activator proteins".

La dynéine complexée à la dynactine est capable de générer un mouvement rapide (supérieur à  $6\mu\text{m}/\text{sec.}$ , en comparaison aux kinésines, plus lentes) de cargo en direction de l'extrémité la moins dynamique des MTs, l'activateur augmentant la processivité du moteur (King et Schroer, 2000). Le complexe moteur actif dynéine/dynactine est impliqué dans de nombreux processus de transport intracellulaire en interphase, notamment le transport axonal rétrograde (Lacey et Haimo, 1992; Lin et Collins, 1992; Paschal et Vallee, 1987), le mouvement de vésicules des endosomes vers les lysosomes (Gruenberg *et al.*, 1989), dans le maintien en position juxtanaucéaire de l'appareil de Golgi (Burkhardt *et al.*, 1997; Harada *et al.*, 1998) ou encore l'organisation et la motilité du réticulum endoplasmique *in vitro* (Allan, 1996a; Allan, 1995). En mitose, dans les cellules de mammifères, le complexe D/D se localise aux kinétochores que le moteur est capable de mouvoir le long des MTs *in vitro* (Hyman et Mitchison, 1991; Pfarr *et al.*, 1990), ainsi qu'aux sites corticaux où la D/D pourrait avoir un rôle dans l'orientation du fuseau de division (Busson *et al.*, 1998). Nous allons à présent passer en revue les différentes sous-unités entrant dans la composition des deux complexes.

#### a) Le complexe moteur dynéine :

La dynéine cytoplasmique est un large complexe moléculaire (**figure 17**) dont la masse moléculaire est de 1,2 MDa qui sédimente à 20 S (Koonce et McIntosh, 1990; Paschal *et al.*, 1987; Vallee *et al.*, 1988). Elle se compose de deux chaînes lourdes (DHC), ainsi que d'un nombre variable de chaînes légères (DIC) et de chaînes légères intermédiaires (DLIC) (pour revues, voir (Holzbaur et Vallee, 1994; King, 2000b; Milisav, 1998).



**Figure 17 :**

Modèle d'organisation moléculaire du complexe dynéine.

Le domaine moteur de la dynéine, schématisé en bleu clair est placé au bout d'un domaine en bâtonnet de la DHC. Les DIC et DLIC interagissent toutes les deux avec le domaine d'homodimérisation des DHC, sans toutefois interagir entre elles. Les DLIC sont également trouvées à la base du complexe moteur, où elles sont en interaction avec les DIC, mais également entre elles (ex : LC8 et Tctex1).

D'après (Vale, 2003).

(1) Les chaînes lourdes :

L'activité motrice du complexe dynéine cytoplasmique repose principalement sur les deux DHC qu'il contient (pour revue sur la structure de la DHC, voir (Asai et Koonce, 2001)). La délétion du gène correspondant est létal pour l'embryon de souris, indiquant le rôle essentiel de la dynéine cytoplasmique dans les processus de transports intracellulaires (Harada *et al.*, 1998). Les DHC ont un poids moléculaire d'environ 530 KDa chacune et forment un homodimère (**figure 17**). Le domaine moteur comprend six répétitions d'un motif AAA (ATPase associated diverse cellular activities, (King, 2000a)) dont les quatre répétitions centrales incluent des motifs de type "P-loop", conservées dans toutes les séquences de DHC isolées à ce jour. La séquence de la première P-loop, P1, est le site d'hydrolyse d'ATP qui conduit au mouvement (Gibbons *et al.*, 1987). Ce site, également appelé V1 (sensible au vanadate) a été identifié comme sensible aux UVs en présence de vanadate (Gibbons *et al.*, 1987). Bien que l'hydrolyse de l'ATP soit restreinte au P1, les trois autres sites pourraient lier le nucléotide et participer ainsi à la régulation de l'activité du moteur (Mocz et Gibbons, 1996). Deux domaines AAA supplémentaires sont présents à la suite des quatre précédents mais exhibent des séquences incomplètes de liaison au nucléotide et sont pour cela notée p5 et p6 (Myster *et al.*, 1999).

Les six domaines P-loop/P-loop apparenté se répartissent sous la forme d'un anneau, tel que révélé par microscopie électronique (Samsó *et al.*, 1998), d'où émerge un bâtonnet porteur du domaine de liaison aux MTs (Gee *et al.*, 1997). Au sein de la structure primaire de la protéine, il se localise entre la P4 et la p6. Cette structure, appelée 'B-link' est constituée par deux domaines en hélice  $\alpha$  associés, formant le corps du bâtonnet. Les deux hélices sont séparées par une séquence de 130 résidus acides aminés (Gee *et al.*, 1997; Koonce, 1997). Cette dernière se replie sous la forme d'un petit domaine globulaire à l'extrémité du bâtonnet, constituant le domaine minimum d'interaction de la DHC avec les MTs. Il a été proposé que le "B-link" puisse constituer un bras de levier. Il réagirait aux modifications conformationnelles des P-loops engendrées par l'hydrolyse de l'ATP au site P1, convertissant l'énergie chimique en énergie mécanique (Asai et Koonce, 2001).

Les DHC sont codées par une famille multi-génique conservée depuis les levures jusqu'à l'homme. Chez ces derniers, on trouve trois gènes dont les produits sont nommés DHC1, 2 et 3 (Vaisberg *et al.*, 1996). Ces trois DHC sont à la base de trois complexes dynéine cytoplasmique dont les tailles et les localisations sont distinctes. La DHC1 constituerait la forme conventionnelle commune, assurant le transport de la plus grande variété d'organites.

La DHC2 serait spécifique de l'appareil de Golgi, assurant sa position juxtanucléaire, comme démontré par micro-injection d'anticorps spécifiquement dirigés contre cette forme. Enfin la DHC3 semble associée à une structure non encore identifiée, correspondant à un compartiment intermédiaire (Vaisberg *et al.*, 1996).

*(2) Les chaînes intermédiaires :*

Sur la base de leurs masses moléculaires respectives, les chaînes intermédiaires de la dynéine peuvent être divisées en deux groupes : les chaînes intermédiaires à proprement parler (DIC) de 74 KDa (Collins et Vallee, 1989; Paschal *et al.*, 1992) et les chaînes légères intermédiaires (DLIC) de 53 à 59 KDa (Gill *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1995).

***Les chaînes intermédiaires :***

La famille de gène codant pour les DIC présente une forte homologie de séquence dans la portion codant pour la partie carboxy-terminale des protéines (pour revue, voir (Holzbaur et Vallee, 1994)). Si deux gènes codent pour des chaînes intermédiaires chez le rat, plus de deux protéines existent, résultant de l'épissage alternatif de leurs transcrits respectifs (Vaughan et Vallee, 1993), et d'une phosphorylation différentielle (Dillman et Pfister, 1994). La structure globale des DIC présente un domaine amino-terminal variable, dont la structure en coiled-coil présage un rôle dans la dimérisation des DIC, suivi par un domaine riche en sérines phosphorylables (Paschal *et al.*, 1992). Le domaine carboxy-terminal comporte six répétitions de type WD (répétitions terminant par un résidu tryptophane, W, et un résidu acide aspartique, D) pouvant être impliquées dans des interactions de type protéine-protéine (Neer *et al.*, 1994). La chaîne intermédiaire de 78 KDa de la dynéine axonémale a été mise en évidence comme pouvant interagir avec la tubuline (King *et al.*, 1991). Cette sous-unité contient deux régions d'interaction avec les tubulines qui ne sont fonctionnelles que dans le cadre de délétions réalisées sur la protéine. Compte tenu de la forte homologie de séquence entre les différents gènes codant pour les DIC on peut supposer que des tels domaines existent au sein des formes non axonémales de la dynéine et peuvent se lier aux MTs de manière régulée.

Les données obtenues par microscopie électronique indiquent que les DIC que comporte le complexe dynéine cytoplasmique se situent à la base du complexe (Steffen *et al.*, 1996), en interaction avec le domaine amino-terminal d'homodimérisation des DHC (**figure 17**, (Habura *et al.*, 1999; Tynan *et al.*, 2000a)). Leur situation, à l'opposé du domaine moteur, laisse supposer un rôle dans la liaison au cargo. L'utilisation d'anticorps dirigés contre la DIC

abolit l'interaction de la dynéine cytoplasmique avec la membrane des organites *in vitro* (Steffen *et al.*, 1997). De manière intéressante, l'épitope reconnu par l'anticorps est situé à proximité de la région de la DIC impliquée dans son interaction avec la p150<sup>Glued</sup>, une sous-unité du complexe dynactine (Karki et Holzbaur, 1995; Vaughan et Vallee, 1995).

*Bien que leur fonction au sein du complexe reste à définir, leur position à la base du moteur et la présence de domaines WD d'interaction protéine-protéine pourrait avoir un rôle dans l'interaction du complexe avec des récepteurs spécifiques sur les cargos ou avec des éléments de régulation restant à identifier.*

### **Les chaînes légères intermédiaires :**

L'analyse des constituants du complexe dynéine cytoplasmique issu du cerveau de bœuf a révélé l'existence de quatre espèces de chaînes légères intermédiaires (53, 55, 57 et 59 Kda). L'utilisation de la phosphatase alcaline réduit leur nombre à deux : DLIC 53/55 et DLIC 57/59. La recherche d'ADNc codant pour les DLIC révèle l'existence d'au moins trois transcrits dont l'un apparaît spécifiquement testiculaire (Gill *et al.*, 1994; Hughes *et al.*, 1995).

L'analyse des séquences protéiques déduites laisse supposer une structure globulaire des DLIC. Les séquences des transcrits portent sur la partie codant le versant amino-terminal de la protéine une P-loop dont aucun auteur n'a vérifié si elle est fonctionnelle. Néanmoins, la présence de ce site indique que les DLIC pourraient avoir une activité ATPasique. Tout comme les DIC, les DLIC interagissent avec la partie amino-terminale des DHC (**figure 17**). Cependant, les deux classes de chaînes intermédiaires ne s'associent pas entre elles. Elles sont néanmoins capables de former un complexe tripartite avec les DHC (Tynan *et al.*, 2000a).

Quelle est la contrepartie fonctionnelle à cette diversité de variants des DLIC ? Une approche de la réponse réside dans l'identification des partenaires des DLIC. La DLIC1 de rat est la seule forme connue de ces chaînes à pouvoir interagir avec la péricentrine (Tynan *et al.*, 2000b), une protéine centrosomale qui s'y accumule de manière D/D dépendante (Young *et al.*, 2000). Il est à noter que les DLIC forment des homopolymères, et qu'au sein d'un complexe dynéine donné, on ne trouve qu'une seule forme de DLIC. La nature de la DLIC présente au sein du complexe pourrait spécifier le type de cargo (vésicule, kinétochore, complexe protéique...) transporté par le complexe dynéine dont elle fait partie. Un second argument en faveur de cette hypothèse provient de l'analyse des complexes formés autour de la DHC2. La DHC2 est impliquée dans le transport intraflagellaire (IFT) chez les eucaryotes inférieurs (Pazour *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 1999) et l'organisation de l'appareil de Golgi chez

les vertébrés (Vaisberg *et al.*, 1996). Une nouvelle DLIC a été identifiée, s'associant avec la DHC : la DLIC3. Bien que sa fonction précise reste à définir, il a été montré que DHC2 et DLIC3 colocalisent avec les protéines formant les particules IFT Ceci suggère un possible rôle de ce type de complexe dynéine dans le transport des particules en question, la spécificité de reconnaissance cargo/moteur étant assurée par la DLIC (Mikami *et al.*, 2002).

(3) *Les chaînes légères :*

L'analyse de la dynéine axonémale chez *Chlamydomonas reinhardtii* indique qu'elle inclue un troisième type de sous-unités, de plus petite taille (de 7,8 à 19,6 KDa), appelées chaînes légères (DLC, (Pfister *et al.*, 1982)). La présence de chaînes analogues dans des cellules dépourvues de cils ou de flagelles laissait penser que les DLC pourraient également faire partie du complexe dynéine cytoplasmique. Trois chaînes de 8, 11 et 14 KDa ont été mises en évidence chez le rat (King et Patel-King, 1995; King *et al.*, 1996a).

La DLC de 8 KDa ou LC8 colocalise et coimmunoprécipite avec la DHC et la DIC (King *et al.*, 1996a). La LC8 apparaît sous la forme d'un dimère (Benashski *et al.*, 1997) dont les interactions avec les DHC/DIC présupposent une localisation à la base du complexe (**figure 17**, voir la discussion de (King *et al.*, 1996a)). Cette sous-unité apparaît essentielle chez la drosophile puisque la délétion du gène correspondant est létal pour l'embryon (Dick *et al.*, 1996) suite à l'activation des voies apoptotiques. Il est difficile de préciser si ce rôle fondamental est lié uniquement à un défaut de fonction de la dynéine cytoplasmique. En effet, outre son rôle au sein du moteur la LC8 a été isolée sous le nom de PIN (protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase), comme un inhibiteur de la NO synthase neuronale (Jaffrey et Snyder, 1996). La LC8 est également une sous-unité fonctionnant au sein de la myosine non-conventionnelle de type V chez le poulet (Espreafico *et al.*, 1992).

En plus des DIC et des LC8, tous les complexes dynéine contiennent au moins un membre de la famille TcTex1. Le terme de TcTex1 (t-complex testis expressed 1) désigne la DLC dont le poids moléculaire est de 14 KDa (King *et al.*, 1996b). La forme dimérisée de TcTex1 est capable d'interagir avec une DIC de 74 KDa, se localisant ainsi à la base du complexe dynéine (**figure 17**, (King *et al.*, 1998)). TcTex1/2 sont également capables d'interagir avec la LC8 (DiBella *et al.*, 2001). La famille TcTex1 inclus d'autres membres apparentés mais divergents comme TcTex2 (Huw *et al.*, 1995) ou encore rp3 dont le nom dérive du fait qu'elle est impliquée dans la survenue de la rétinite pigmentaire de type 3 liée au chromosome X (Musarella *et al.*, 1991). L'expression des deux protéines semble être tissu-

spécifique puisque rp3 est prédominante dans le foie et le cerveau où TcTex1 est le moins exprimé (King *et al.*, 1998; Roux *et al.*, 1994), et régulée au cours du développement cerveau (Kai *et al.*, 1997). Bien qu'on puisse noter la présence de deux formes de DLC au sein d'une même cellule, les deux chaînes légères sont mutuellement exclusives pour un complexe dynéine donné (Chuang *et al.*, 2001). Une fois de plus, la composition de chaque complexe moteur semble dépendre de son rôle intracellulaire. C'est ainsi que l'on retrouve TcTex1 préférentiellement associée à l'appareil de Golgi où elle colocalise partiellement avec la DIC et la p150<sup>Glued</sup> (Tai *et al.*, 1998).

La p29 est une DLC à propos de laquelle peu de choses sont connues. Les données disponibles indiquent qu'elle régule la vitesse de la dynéine axonémale tant *in vitro* qu'*in vivo*, de manière phosphorylation dépendante (Barkalow *et al.*, 1994; Hamasaki *et al.*, 1991). Elle est également présente au sein de la dynéine cytoplasmique où son rôle et sa position restent à définir (Wang et Satir, 1998).

Le dernier type de chaîne légère identifié constitue la famille *roadblock/LC7* (**figure 17**). Chez la drosophile, l'absence de *roadblock* conduit à des défauts du transport axonal et de la ségrégation des chromosomes (Bowman *et al.*, 1999). D'autres investigations sur le rôle de la famille des LC7 sont nécessaires afin de déterminer si les phénotypes observés sont en lien direct avec un défaut de fonction du complexe moteur.

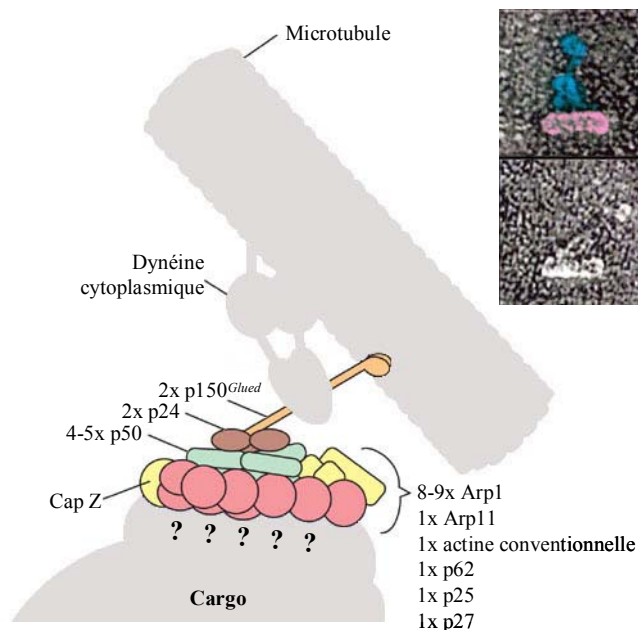
#### ***b) Le complexe dynactine :***

Le terme de complexe dynactine désigne un large complexe moléculaire dont la masse moléculaire équivaut à celle de la dynéine cytoplasmique, soit 1,2 MDa, sédimentant également à 20 S (**figure 18**, (Schroer et Sheetz, 1991)).

Comme nous l'indiquions en introduction à cette partie, la dynéine seule, adsorbée sur un substrat approprié est capable d'induire le déplacement de MTs stabilisés au taxol (Lye *et al.*, 1987; Schnapp et Reese, 1989) ou d'axonèmes (Paschal *et al.*, 1991; Paschal et Vallee, 1993) à de très faibles vitesses, comparées à celles observées *in vivo* (0,5µm/sec contre >6µm/sec). Un second essai fonctionnel consiste à adsorber sur lamelle des MTs stabilisés et tester le transport de vésicules purifiées sur un "coussin" de saccharose. Dans ces conditions, en l'absence de tout autre facteur, les vésicules se lient aux MTs et entreprennent un mouvement rétrograde lent (Schroer *et al.*, 1989). L'ajout de cytosol restaure la composante rapide de leur mouvement. Les auteurs ont isolé à partir d'extraits cytosoliques deux fractions capables de restaurer le mouvement rapide, dont les coefficients de sédimentation sont 9 et 20

S (Schroer et Sheetz, 1991). La seconde fraction est la seule à avoir été caractérisée et constitue le complexe dynactine (pour revues, voir (Allan, 2000; Allan, 1994; Holleran *et al.*, 1998; Schroer, 1996)). Les études récentes indiquent qu'il augmente l'efficacité du transport dynéine dépendant en agissant à la fois comme activateur du moteur et comme facteur de processivité du complexe dynéine (King et Schroer, 2000).

Le complexe dynactine se compose d'une dizaine de classes de sous-unités que nous allons à présent passer en revue.



**Figure 18 :**

Modèle d'organisation moléculaire du complexe dynactine.

A droite : Deux clichés de microscopie électronique illustrant l'organisation générale du complexe dynactine.

A gauche : Une représentation schématique de la composition de la dynactine et de la position relative de ses sous-unités.

Adapté de (Allan, 2000; Eckley *et al.*, 1999).

(1) Le filament de 37 nm :

La base du complexe dynactine forme un court filament de 37 nm (**figure 18**, (Schafer *et al.*, 1994a)), constitué majoritairement d'une protéine de 45 KDa, apparentée à l'actine : Arp1 (actin related protein 1) encore dénommée contractine (Clark et Meyer, 1992) ou active RPV (related protein from vertebrates, (Lees-Miller *et al.*, 1992)). Arp1 diffère néanmoins de l'actine conventionnelle de par ses propriétés. *In vivo*, elle n'a été identifiée jusqu'à présent qu'au sein du complexe dynactine. Sa polymérisation semble être étroitement régulée puisque les seules structures qu'elle forme comprennent un nombre limité de sous-unités (8 à 13, (Schafer *et al.*, 1994a)). Néanmoins, la surexpression de Arp1 peut conduire à la formation de filaments de taille variable, indiquant la possibilité d'un étroit contrôle de la longueur du polymère (Holleran *et al.*, 1996). De plus, les mêmes auteurs ont démontré que, contrairement aux microfilaments d'actine, les filaments Arp1 ne sont pas sensibles aux traitements par la cytochalasine D, une drogue dépolymérisant les microfilaments.



Les raisons de cette stabilité sont sans doute à chercher du côté des partenaires du filament Arp1. Tout comme les microfilaments d'actine, cette structure comporte deux extrémités distinctes : une extrémité pointue/(-) et la seconde dite barbée/(+). Les protéines associées à Arp1 diffèrent entre ces deux extrémités.

A l'extrémité pointue s'associent deux protéines (1 exemplaire de chacune par complexe, **figure 18**) dont les poids moléculaires apparents sont de 32 et 37 KDa, comme démontré par immunolocalisation en microscopie électronique (Schafer *et al.*, 1994a). Leur identification par immunodétection révèle qu'il s'agit des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ 2 du complexe CapZ (Schafer *et al.*, 1994b), impliqué dans la stabilisation du bout (-) des MFA au sein du muscle strié squelettique (Caldwell *et al.*, 1989; Casella *et al.*, 1989).

A l'extrémité barbée s'associent quatre types de protéines, divisées en trois classes (**figure 18**). Le fractionnement réalisé sur le complexe dynactine indique que la p62, le p25, la p27 et une protéine de 43 KDa cosédimentent au sein d'un sous-complexe à 7 S (1 exemplaire de chacune par complexe, (Eckley *et al.*, 1999)). Peu de choses sont actuellement connues sur le rôle de ces sous-unités. Les hypothèses proposent une fonction d'ancrage et/ou de régulation de la dynactine.

La p62, par exemple, semble être une protéine bifonctionnelle. Bien que n'étant trouvée qu'au sein du complexe dynactine, elle est capable d'interagir avec l'actine conventionnelle. Ces données suggèrent un rôle de la p62 dans l'ancrage cortical de la dynactine (Garces *et al.*, 1999). Le rôle de la p25 reste à définir, mais elle pourrait être impliquée elle aussi dans la reconnaissance du cargo (Eckley *et al.*, 1999). La p27 a été identifiée comme la sous-unité  $\beta$  de la caséine kinase II (Karki *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que cette kinase est capable de phosphoryler la DIC (isoforme IC2 de rat), abolissant ainsi l'interaction DIC/p150<sup>Glued</sup> (Vaughan *et al.*, 2001). La protéine de 43 KDa a été caractérisée comme apparentée à l'actine, sous le nom de Arp11 (Eckley *et al.*, 1999). Elle forme un complexe avec les protéines précédentes, ressemblant à Arp2/3 dont on sait qu'il régule localement l'assemblage de l'actine (Mullins *et al.*, 1998; Mullins *et al.*, 1997). Le filament de 37 nm a été démontré comme pouvant s'associer au réseau de spectrine. Si en 1996 un doute pouvait subsister sur la sous-unité du complexe responsable de l'interaction avec la spectrine, les travaux publiés en 2001 apportent la preuve qu'Arp1 en est la cible (Holleran *et al.*, 2001; Holleran *et al.*, 1996).

Les liens entre le filament de 37 nm et l'actine conventionnelle restent néanmoins à mieux définir. En effet, plusieurs études se contredisent sur la présence éventuelle d'une molécule d'actine conventionnelle au sein du complexe Arp1 (Holleran *et al.*, 1996; Schafer *et al.*, 1994a). Bien qu'Arp1 et l'actine puisse copolymériser *in vitro* (Melki *et al.*, 1993), les immunoprécipitats et préparation de dynactine purifiée sont dépourvus de cette dernière (Eckley *et al.*, 1999; Holleran *et al.*, 1996). Si l'actine conventionnelle devait être absente du complexe, la "contamination" observée pourrait être le résultat de son interaction avec les protéines CapZ de l'extrémité pointue du filament de 37 nm.

(2) *Le bras latéral de 24 nm :*

Le terme de dynactine a souvent été associé non au complexe entier mais à son constituant le plus large, la p150<sup>Glued</sup>. Initialement clonée chez le rat et le poulet, cette sous-unité forme le long bras latéral de 24 nm (**figure 18**) qui émerge du filament Arp1 (Eckley *et al.*, 1999; Gill *et al.*, 1991; Holzbaur *et al.*, 1991). Dans sa partie amino-terminale, la p150<sup>Glued</sup> comporte une analogie structurale avec la CLIP-170 puisqu'elle dispose d'un unique motif CAP-Gly. Cette particularité la fait entrer dans la famille des protéines à domaine CLIP-170 (Li *et al.*, 2002; Riehemann et Sorg, 1993). Au sein du complexe dynactine, elle forme un dimère. Les études menées sur des extraits de cerveau de veau ont permis de mettre en évidence deux protéines réactives pour les anticorps dirigés contre la p150<sup>Glued</sup>, la première a un poids moléculaire de 150 KDa tandis que la seconde migre à 135 KDa (Paschal *et al.*, 1993). Un seul gène ayant été identifié à ce jour chez les vertébrés, ces deux formes semblent résulter d'un épissage alternatif du transcrite (Holzbaur et Tokito, 1996). La forme de 130 KDa est dépourvue du domaine CAP-Gly, présent dans la forme 150 KDa (Tokito *et al.*, 1996). De plus, elle est spécifiquement exprimée dans le cerveau. Le problème de l'hétérodimérisation possible des p135<sup>Glued</sup> et p150<sup>Glued</sup> demeure un sujet soumis à controverse. La seule certitude demeure que les deux isoformes sont capables de former des homodimères, intégrés au sein de complexes dynactine différents (Tokito *et al.*, 1996). L'apport fonctionnel offert au complexe par la présence d'une sous-unité capable de se lier aux MTs reste à définir.

Outre son domaine de liaison aux MTs, la p150<sup>Glued</sup> possède deux autres domaines d'interactions avec des composants des complexes dynéine et dynactine.

Le premier, situé au niveau de ses résidus carboxy-terminaux consiste en un motif chargé dont la séquence est KKEK. Cette séquence est connue comme nécessaire à la villine pour sa liaison à l'actine (Friederich *et al.*, 1992). Au sein de la p150<sup>Glued</sup>, elle est responsable

de son interaction avec la protéine Arp1 (Waterman-Storer *et al.*, 1995). Chez la drosophile, les tronctions observées des mutants de *Glued* sont incapables de former le bras latéral de la dynactine (McGrail *et al.*, 1995).

Le second est situé dans la portion amino-terminale de la protéine. Il est responsable de la liaison du complexe dynactine au moteur dynéine cytoplasmique, *via* sa chaîne intermédiaire (portion amino-terminale de la IC2 chez le rat, (Karki et Holzbaur, 1995; Vaughan et Vallee, 1995)). Cette interaction semble pouvoir être modulée par la phosphorylation de la DIC par la caséine kinase II (Karki *et al.*, 1997; Vaughan *et al.*, 2001).

De manière intéressante, les interactions de la p150<sup>Glued</sup> ne se limitent pas aux DIC. En effet, on lui connaît à ce jour deux partenaires apparentés à la famille des kinésines, ainsi qu'un partenaire de la famille des +TIPs.

La première, HsEg5 se localise en prophase aux pôles du fuseau après phosphorylation par la p34<sup>cdc2</sup> (Blangy *et al.*, 1995) où elle participe à la focalisation des bouts (-) des MTs (Kapoor *et al.*, 2000). La phosphorylation de HsEg5 augmente son affinité pour la p150<sup>Glued</sup> (Blangy *et al.*, 1997).

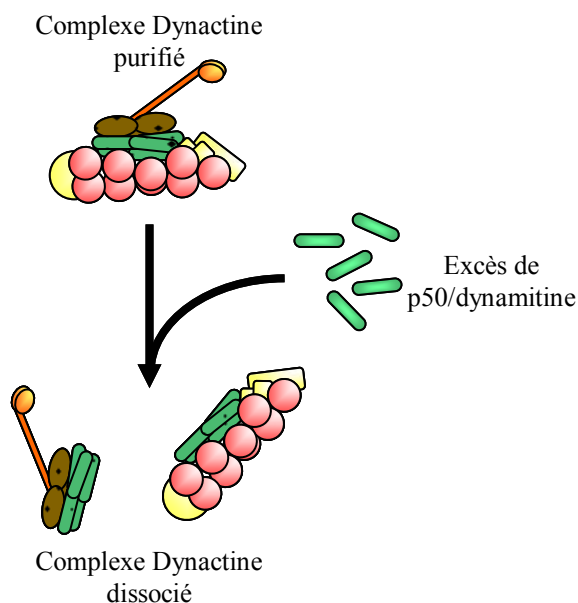
La seconde est la kinésine II de xénope. Au sein des mélanophore, des organites particuliers chargés de pigment, les mélanosomes, sont capables de se redistribuer sous l'action de l'AMPc (Daniolos *et al.*, 1990). L'augmentation de la concentration intracellulaire provoque une dispersion kinésine II dépendante des mélanosomes (Tuma *et al.*, 1998), tandis que le mouvement inverse dépend du complexe D/D (Nilsson et Wallin, 1997). Une étude parue en début d'année démontre l'implication de la dynactine dans les deux types de mouvements (Deacon *et al.*, 2003). En effet, la p150<sup>Glued</sup> est capable d'interagir directement avec la XKAP (*Xenopus* kinesin II-associated protein), elle-même partenaire de la kinésine II. Les tests de compétition d'association à la p150<sup>Glued</sup> ont permis de démontrer que les interactions avec la DIC ou la kinésine II sont mutuellement exclusives. La surexpression de la dynamitine (voir plus bas) abolit le transport dans les deux directions, indiquant que l'ensemble du complexe dynactine est requis pour le mouvement kinésine II dépendant. Ces données permettent de postuler un rôle d'interrupteur moléculaire pour le complexe dynactine, permettant d'activer l'un ou l'autre des moteurs. Ceci implique également que la dynactine soit capable de piloter la coordination des deux moteurs au moment du changement de directionnalité du mouvement des mélanophores.

Le troisième partenaire de la p150<sup>Glued</sup> n'est autre qu'EB1, une +TIP avec laquelle elle colocalise aux bouts (+) des MTs (Berrueta *et al.*, 1999). Le complexe isolé par immunoprécipitation comprend d'autres membres du complexe dynéine/dynactine : la DIC et la p50 (voir plus bas). Cette interaction est indépendante d'APC, qui n'est pas retrouvé par immunoprécipitation. Néanmoins, il est intéressant de noter qu'APC est capable d'interagir avec la protéine de mammifère équivalente à XKAP (Jimbo *et al.*, 2002). Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité d'une interaction indirecte entre APC et la p150<sup>Glued</sup>.

(3) Autres membres du complexe dynactine :

Le complexe activateur comporte deux autres types de sous-unités, identifiées après isolement du complexe.

Le premier est la p24 pour laquelle peu de choses sont connues. L'analyse des sous-complexes obtenus en utilisant l'ion chaotropique KI permet de mettre en évidence la protéine au sein d'un complexe contenant la p150<sup>Glued</sup> et la p50/dynamitine (Eckley *et al.*, 1999). Ces données semblent indiquer une possible interaction avec le bras latérale de la dynactine (**figure 18**).



**Figure 19 :**

Effet de l'excès de dynamitine sur l'intégrité du complexe dynactine.

En présence d'un excès de dynamitine, le complexe dynactine se dissocie en deux entités, l'une contenant le filament de 37 nm, l'autre le bras latérale de 24 nm. La p50 reste associée aux deux sous-complexes.

Adapté de (Allan, 2000; Allan, 1996b), d'après les données de (Eckley *et al.*, 1999).

Le second est la p50 ou dynamitine. Cette protéine est présente à raison de 4 à 5 copies par complexe activateur (**figure 18**, (Eckley *et al.*, 1999; Paschal *et al.*, 1993)). Les mêmes auteurs ont analysé par sédimentation sur gradient de saccharose la composition des sous-complexes obtenus en plaçant le complexe dynactine purifié en présence d'un large excès (30 fois) de dynamitine recombinante (Wittmann et Hyman, 1999). Dans ces conditions, le bras

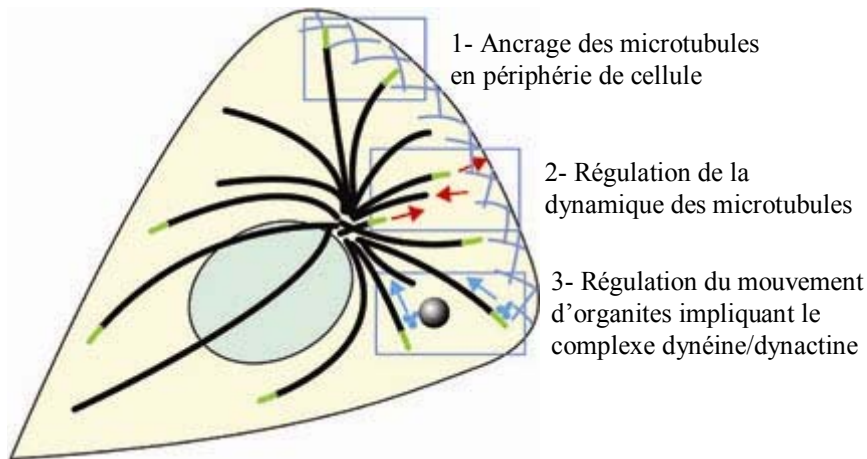
latéral est détaché du filament Arp1, et la p50 demeure associée à chacun d'entre eux (**figure 19**). De ces données, on peut supposer que la dynamitine joue un rôle dans la liaison du bras latéral/p150<sup>Glued</sup> au filament de 37 nm/Arp1. Pour son habilité à rompre l'intégrité du complexe dynactine, la p50 a été rebaptisée "dynamitine". Elle constitue un formidable outil, quoique non spécifique d'un cargo donnée, permettant de découpler le moteur dynéine de son activateur *in vivo* (Burkhardt *et al.*, 1997; Echeverri *et al.*, 1996).

Comme nous l'avons vu, le complexe dynéine est capable d'interagir avec le complexe dynactine par association de la DIC et de la p150<sup>Glued</sup> (Karki et Holzbaur, 1995; Vaughan et Vallee, 1995) comme démontré *in vitro*. La dynactine est requise pour l'activation et la processivité du moteur (King et Schroer, 2000; Schroer et Sheetz, 1991) *in vitro*. *In vivo*, la microinjection d'anticorps dirigés contre la DIC réalisée dans des cellules de mammifères inhibe l'assemblage du moteur avec son activateur, ayant des conséquences identiques à la dissociation du complexe dynactine obtenu par surexpression de la dynamitine (Burkhardt *et al.*, 1997; Echeverri *et al.*, 1996). Dans ces deux conditions, le transport rétrograde est perturbé : les endosomes précoces et tardifs ainsi que les lysosomes sont redistribués en périphérie de la cellule, l'appareil de Golgi est dissocié et colocalise avec le compartiment intermédiaire (Burkhardt *et al.*, 1997). Ces éléments sont des preuves tangibles d'un fonctionnement de concert des deux complexes. Quand on s'intéresse au complexe D/D un paradoxe apparaît : à ce jour, aucune expérience n'a permis d'isoler la dynéine associée à la dynactine à partir d'extraits cellulaires.

## D. Quelles fonctions pour la CLIP-170 en interphase ?

Pour résumer ce que nous venons de le voir, on peut dire que la CLIP-170 est impliquée dans trois principaux mécanismes en interphase (**figure 20**).

Si l'on se réfère aux données obtenues chez *S. pombe* pour Tip1p, la CLIP-170 pourrait être impliquée dans la dynamique des MTs en servant de facteur anti-catastrophe. Cette protéine étant nécessaire à l'adressage aux bouts (+) d'autres +TIPs, il reste à définir si cette action est à attribuer directement à la CLIP-170 ou si elle résulte du recrutement d'autres facteurs. Néanmoins, les résultats obtenus *in vitro* laissent penser qu'elle agit directement sur la dynamique des MTs.



**Figure 20 :**

Illustration des trois rôles connus pour la CLIP-170 en interphase.

D'après (Galjart et Perez, 2003).

La CLIP-170 a été identifiée comme un partenaire d'IQGAP1. Elle forme un complexe tripartite qui inclut les deux protéines, ainsi qu'une forme activée de cdc42 ou de Rac1. Compte tenu des localisations corticales de ces dernières, la CLIP-170 est un bon candidat permettant l'ancrage périphérique des MTs, *via* leurs bouts (+).

Enfin, la CLIP-170 est localisée avec le complexe D/D sur les endosomes. La CLIP-170 étant capable de lier de manière statique les endosomes aux MTs, la CLIP-170 pourrait permettre l'ancrage préalable aux mouvements de cargos aux MTs.

*Nous allons à présent voir que la CLIP-170 colocalise également avec le complexe D/D aux kinétochores (KTs) prémétaphasiques. Dans l'hypothèse où le modèle de Rickard et Kreis serait avéré, le KT pourrait constituer un second cargo modèle.*

### III. Quelle(s) fonction(s) pour la CLIP-170 en mitose ?

La division cellulaire ou mitose désigne l'ensemble des événements requis pour la ségrégation équitable entre deux cellules filles du patrimoine génétique dupliqué d'une cellule mère. En préalable à la division, au cours de la phase S, la cellule s'équipe d'un second centre de nucléation des MTs, organisé autour d'une paire de centrioles dupliqués à partir de la paire existante. Au cours de la phase G2/prophase, les deux MTOC migrent le long de l'enveloppe nucléaire en organisant à leur périphérie une structure radiaire de MTs appelée **aster**. Ils constituent "l'embryon" des pôles du futur fuseau de division des mammifères.

Cette phase de préparation de la division est également caractérisée par un changement radical de la dynamique des MTs : leur demi-vie est diminuée (>10min. en interphase contre <60sec. en mitose), comme pour activer le mécanisme de recherche et capture qui leur est associé. Le **fuseau de division** servira de support aux mouvements et à l'ancrage des chromosomes au cours de la division. La mise en place de cette structure assure la répartition équitable des chromatides soeurs entre les deux cellules filles.

Le positionnement de l'axe joignant les deux pôles du fuseau détermine le devenir des deux cellules filles. En effet, au sein d'un épithélium simple, si l'axe du fuseau est parallèle à l'axe de l'épithélium, les deux cellules filles s'intégreront à la monocouche cellulaire. En revanche, si cet axe est perpendiculaire au plan de l'épithélium, les deux cellules filles s'intégreront à deux couches cellulaires différentes. Un déficit dans le contrôle de l'orientation du fuseau pourrait être impliqué dans la tumorigenèse et l'évolution maligne de certains cancers. De même, l'aneuploïdie est une anomalie portant sur le nombre de chromosomes présents dans une cellule. Elle résulte d'un dysfonctionnement de la machinerie impliquée dans la répartition conforme de l'information génétique, mise en œuvre au cours de la mitose. Cette aberration est rencontrée dans de nombreux cas de cancers et peut résulter d'un mauvais fonctionnement de l'interface chromosome/MT.

Nous allons à présent voir comment le fuseau de division se forme, et décrire ses interactions avec des régions spécialisées du chromosome mitotique : les **kinétochores** (KTs).

## A. Assemblage du fuseau de division :

### 1. Transition G2/M et changement de dynamique des MTs :

L'assemblage du fuseau de division est initié peu avant la rupture de l'enveloppe nucléaire. Il débute par un profond changement des paramètres de l'instabilité dynamique des MTs qui se voit stimulée : la demi-vie des MTs individuels est réduite (Inoue et Salmon, 1995; Rusan *et al.*, 2001; Zhai *et al.*, 1996). Ces modifications de dynamique correspondent à l'activation de la p34<sup>cdc2</sup>. Les tests menés principalement *in vitro*, sur extraits d'œufs de xénopes, ont permis d'identifier plusieurs MAPs dont l'état général de phosphorylation dépend du cycle cellulaire. Parmi elles, la protéine Op18/stathmine (oncoprotéine 18) est phosphorylée en mitose (Larsson *et al.*, 1997). Une phosphorylation ménagée de la protéine n'inhibe pas son activité de déstabilisation des MTs. En revanche, comme nous le verrons, une régulation locale de son activité peut intervenir. Une seconde cible potentielle de la kinase cycline dépendante est le couple antagoniste XKCM1/XMAP215. La p34<sup>cdc2</sup> induirait la phosphorylation et l'inactivation de la MAP stabilisatrice XMAP215. Le facteur promoteur de catastrophe XKCM1 deviendrait alors dominant (Vasquez *et al.*, 1999).

L'organisation isotrope des MTs par les asters résulte de deux phénomènes. Tout d'abord, les deux asters sont capables de nucléer de nouveaux MTs et de les ancrer de manière radiaire. Récemment, le groupe de Patricia Wadsworth a mis en évidence que tous les MTs n'étaient pas ancrés aux centrosomes. Certains s'organisent sous forme de faisceaux qui vont progressivement être transportés le long des MTs, en direction du centre de l'aster (Rusan *et al.*, 2002). Plusieurs faisceaux peuvent s'associer et former des structures radiaires auxquelles les auteurs font référence sous le terme de "**foci**". Ceux-ci sont capables de glisser le long des MTs émanant d'un centrosome et de fusionner avec l'aster en question. L'injection d'anticorps dirigés contre la chaîne intermédiaire de la dynéine cytoplasmique abolit ces mouvements, impliquant ce moteur dans la migration et la fusion des foci. La kinésine antérograde (à destination du bout (+)) HsEg5, impliquée dans la séparation des centrosomes en prophase (Gaglio *et al.*, 1996), ne participe pas à ce phénomène, comme démontré par l'utilisation de son inhibiteur spécifique, le monastrol (Kapoor *et al.*, 2000).



## 2. *Microtubules et rupture de l'enveloppe nucléaire :*

De manière concomitante à l'assemblage précoce du fuseau de division, l'enveloppe nucléaire va se rompre. La dynéine cytoplasmique ainsi que la dynactine ont été pour la première fois localisées sur l'enveloppe nucléaire (NE) en prophase par notre laboratoire (Busson *et al.*, 1998). Cette localisation particulière a trouvé sa justification fonctionnelle en 2002 (Salina *et al.*, 2002). Bien que les MTs ne soient pas nécessaires à la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEB, nuclear envelope breakdown), ils la facilitent. En effet, le traitement des cellules au nocodazole retarde la survenue de la NEB. De même, la dislocation du complexe D/D par surexpression de la p50 ou de la p62, cette dernière abolissant l'adressage de la dynéine aux membranes (Quintyne *et al.*, 1999), gêne la NEB. En situation normale, les deux centrosomes sont localisés au sein de deux poches ménagées dans l'enveloppe nucléaire. Tous deux sont interconnectés par des MTs dits interpolaire, eux-mêmes entourés de membrane nucléaire. Le complexe D/D est supposé favoriser la NEB en permettant l'interaction entre la NE et les MTs. Une fois activé, le moteur serait à l'origine de forces exercées sur la NE, induisant sa rupture.

Une fois la NEB accomplie, les MTs pénètrent l'espace qui définissait précédemment le noyau. Les MTs vont établir des contacts avec les chromosomes, soit sur leurs bras, soit au niveau d'une région spécialisée que nous décrirons dans la prochaine section, le **kinétochore**. Le contexte dans lequel évoluent les MTs est dorénavant différent : la présence de la chromatine a une influence sur leur dynamique. *In vitro*, au sein d'extraits mitotiques dépourvus de centrosomes et de kinétochores, les MTs polymérisés sont capables d'organiser un fuseau autour de billes recouvertes d'ADN (Heald *et al.*, 1996). Les MTs le constituant sont plus longs que ceux obtenus en absence d'ADN.

## 3. *L'"effet chromatine" :*

La dynamique des MTs semble donc influencée localement par la présence d'acides nucléiques. L'instabilité dynamique des MTs étant dictée par l'association/dissociation de facteurs stabilisant/déstabilisants, les investigateurs ont cherché à identifier les protéines susceptibles de s'associer aux chromosomes et d'influencer l'état de phosphorylation des MAPs. De tels acteurs pourraient établir un gradient de phosphorylation autour des chromosomes, générant une zone de stabilisation des MTs à proximité de la chromatine. Cette notion de gradient dynamique est connue pour la thématique spécifique de l'import/export de protéines entre le cytoplasme et le noyau interphasiques. Dans ce cadre, la petite protéine G

de la famille Ras, Ran est impliquée dans la génération d'un gradient où sa forme liée au GTP prédomine dans le noyau, alors que celle liée au GDP est majoritairement trouvée dans le cytoplasme (pour revues, voir (Gorlich et Kutay, 1999; Mattaj et Englmeier, 1998)). L'état d'équilibre entre les deux formes implique la présence de GEF nucléaires et de GAP cytoplasmiques. L'une des GEF de Ran, RCC1, est associée à la chromatine du noyau interphasique (Hetzer *et al.*, 2000) ainsi qu'au chromosome mitotique (Carazo-Salas *et al.*, 1999). RCC1 pourrait générer un gradient de Ran-GTP en périphérie des chromosomes, induisant la nucléation et la stabilisation de MTs. L'implication éventuelle de Ran-GTP dans les changements de dynamique des MTs observés en périphérie des chromosomes est appelée "**effet chromatine**" (pour revues, voir (Carazo-Salas, 2001; Carazo-Salas et Brunet, 2002; Karsenti et Vernos, 2001)). Cette hypothèse est d'ailleurs étayée par les résultats analogues obtenus en utilisant une forme constitutivement liée au GTP de Ran (Kahana et Cleveland, 1999). L'action de Ran-GTP pourrait être médiée *via* l'un de ces effecteurs, TPX2 (Targeting protein for Xklp2, (Wittmann *et al.*, 1998)). Cette protéine est requise pour la stabilisation Ran dépendante des MTs, comme démontré au sein d'extraits d'œufs de xénope (Gruss *et al.*, 2001), ainsi qu'*in vivo* en abolissant son expression dans les cellules HeLa (Gruss *et al.*, 2002). TPX2 est capable de se lier aux MTs et d'interagir avec la kinésine Xklp2 qu'elle localise aux bouts (-) des MTs (Wittmann *et al.*, 1998). La manière dont TPX2 régule la dynamique des MTs ainsi que le degré d'implication du moteur associé restent à définir.

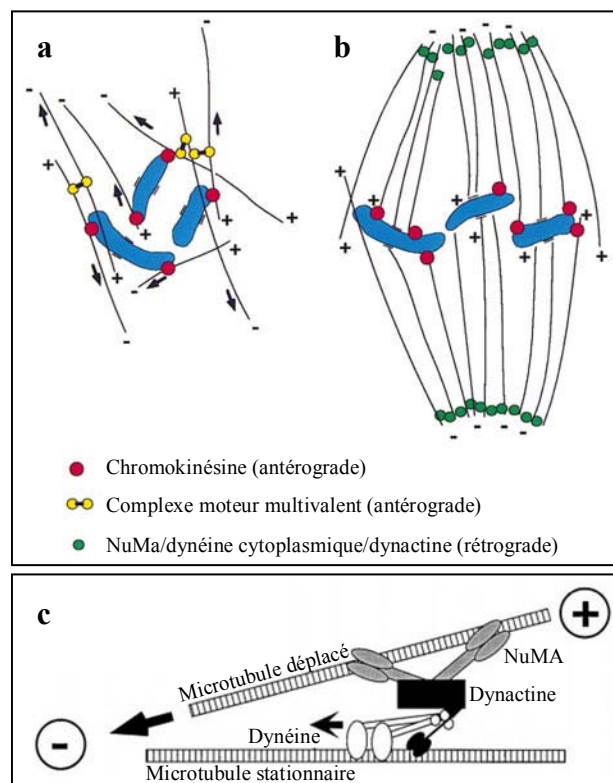
#### ***4. Moteurs moléculaires et focalisation des microtubules :***

*In vivo*, les MTs du fuseau sont nucléés par les deux centrosomes de façon isotrope, formant les asters. Le contact avec la chromatine, comme nous venons de le voir, stabilise certains MTs. Néanmoins, si on réalise l'ablation d'un ou des deux centrosomes sur cellules de mammifères vivantes, on constate que les MTs demeurent capables de former un fuseau bipolaire (Khodjakov *et al.*, 2000). Cet aspect de la distribution des MTs ne réside pas seulement dans le fait qu'ils soient nucléés par le pôle du fuseau. C'est ainsi qu'a été proposée une seconde voie de formation du fuseau de division, impliquant l'association de MTs et leur organisation au moyen de moteurs moléculaire. Cette voie implique deux évènements concomitants. Le premier consiste à organiser deux ensembles de MTs parallèles autour de la chromatine. Cette fonction semble pouvoir être réalisée chez les mammifères grâce à une protéine apparentée aux kinésines, la chromokinésine (Wang et Adler, 1995) dont la particularité est de présenter à la fois un domaine moteur, et un domaine de liaison à l'ADN. En mitose, elle est capable de s'associer aux bras des chromosomes, produisant un

mouvement en direction de l'extrémité la plus dynamique des MTs. La déplétion de son orthologue Xklp1 d'extrait de xénopes perturbe de la bipolarité de fuseau de division obtenus *in vitro* (Vernos *et al.*, 1995). Le rôle de la chromokinésine ancrée aux chromosomes pourrait être de déplacer les MTs de telle sorte qu'ils adoptent une organisation parallèle, leurs extrémités (+) pointant vers le chromatine. L'intervention de ce moteur peut expliquer l'orientation des MTs (**figure 21**). En revanche, d'autres moteurs doivent intervenir afin de focaliser leurs bouts (-).

La surexpression de la p50/dynamitine dans les cellules COS-7 est à l'origine de fuseaux mitotiques anormaux, dont la morphologie est asymétrique, chaque demi fuseau étant orienté indépendamment du second (Echeverri *et al.*, 1996). *In vitro*, la perturbation de la fonction du complexe D/D conduit au même phénotype (Gaglio *et al.*, 1997; Gaglio *et al.*, 1996), où les bouts (-) des MTs apparaissent moins focalisés. Néanmoins, le complexe D/D n'est pas le seul moteur moléculaire à direction (-) impliqué. En effet l'inactivation du complexe D/D et du moteur (-) XCTK2 (*Xenopus* carboxy-terminal kinesin 2) au sein d'extraits de xénope provoque un défaut sévère de focalisation des bouts (-) des MTs de fuseaux assemblés *in vitro*. L'inhibition de XCTK2 seule provoque un phénotype moins prononcé, indiquant qu'en dépit d'une coopération des deux moteurs moins dans cette fonction, le rôle du complexe D/D est dominant (Walczak *et al.*, 1998). Si l'on peut concevoir que le moteur permette le déplacement d'un MT par rapport à un second auquel le complexe D/D est ancré, comment expliquer son rôle dans la focalisation des MTs du fuseau ? La solution réside une nouvelle fois dans l'étude des partenaires du complexe. La protéine NuMA (nuclear protein that associates with the mitotic apparatus) est nucléaire en interphase et se localise aux pôles du fuseau de division mitotiques (Compton et Cleveland, 1994). Elle possède son propre domaine de liaison aux MTs, et est capable d'interagir avec le complexe D/D (Merdes *et al.*, 1996). En mettant en œuvre un test d'assemblage de fuseaux *in vitro*, les auteurs ont pu démontrer que la déplétion de NuMA entraîne une co-déplétion du complexe D/D. La conséquence est une absence de focalisation des bouts (-) des MTs. L'hypothèse avancée par les auteurs consiste à expliquer que NuMA sert à l'ancrage stable du complexe D/D le long de MTs statiques (**figure 21 c**). Ainsi, le complexe moteur, en s'associant à des MTs libres les déplace, focalisant leurs extrémités (-). Dans certains cas, NuMA s'associe au complexe D/D sans pour autant l'ancrer aux MTs : il en résulte un transport D/D dépendant de NuMA en direction des bouts (-), où elle se localisent aux pôles du fuseau (Merdes *et al.*, 2000). La concentration de cette protéine aux pôles forme un réseau insoluble qui pourrait

permettre l'ancrage des MTs et le maintien de leur focalisation (Saredi *et al.*, 1996; Saredi *et al.*, 1997; Sharp *et al.*, 1999).



**Figure 21 :**

Contribution des moteurs moléculaires à la focalisation et l'ancrage des microtubules du fuseau.

a- En absence de centrosomes, les chromokinésines associées à la chromatine (en bleu) déplacent les microtubules en direction de leurs bouts (+). Les microtubules sont ainsi organisés en un réseau parallèle uniformément orienté.

b- Le complexe NuMA/dynéine/ dynactine et le moteur rétrograde XCTK2 assurent le glissement des microtubules, focalisant leurs extrémités (-) : le fuseau bipolaire est formé. NuMA subit un transport dynéine/dynactine dépendant en direction des pôles où elle participe à l'ancrage des bouts (-) des microtubules.

c- Détail du mécanisme de focalisation des microtubules impliquant NuMA. NuMA sert à l'ancrage du complexe moteur dynéine/dynactine le long d'un microtubule statique. Le moteur moléculaire permet le déplacement relatif d'un second microtubule, mobile.

D'après (Merdes et Cleveland, 1997; Merdes *et al.*, 2000).

En plus des moteurs rétrogrades évoqués plus haut, certaines kinésines de la famille BimC, participent à la formation du fuseau de division. Cette classe de moteurs se présente sous la forme d'un homotétramère bipolaire, pouvant ainsi établir un pontage entre deux MTs. L'interférence avec le fonctionnement de cette classe de kinésines entraîne la formation de fuseaux monopolaires dont les MTs perdent la focalisation (Blangy *et al.*, 1995; Gaglio *et al.*, 1996; Sawin *et al.*, 1992). Eg5 est un membre de la famille BimC, qui se localise le long du fuseau de division et est enrichi au niveau des pôles (Sawin *et al.*, 1992). Compte tenu de l'orientation des MTs au sein du fuseau de division, il est difficile d'envisager comment un moteur rétrograde puisse participer à la focalisation des MTs, hormis s'il s'agit d'une chromokinésine. Néanmoins, une étude récente suggère qu'Eg5 pourrait être immobilisée sur une matrice statique, le long de laquelle le moteur pourrait transloquer les MTs (Kapoor et Mitchison, 2001).

### 5. Le fuseau de division est constitué de trois types de MTs :

Au final, au sein des cellules de mammifère, le fuseau de division résulte de l'assemblage de trois types de MTs, identifiable par leur localisation et leurs interactions au

sein de la structure bipolaire. Les MTs **astériens** sont définis comme les MTs issus d'un pôle et dont le bout (+) est dirigé à l'extérieur du fuseau, en regard du cortex cellulaire. Les MTs **interpolaires** ont leur extrémité la plus dynamique en regard du pôle opposé à celui dont ils sont issus. Enfin, les MTs **kinétochoriens** font parti d'un faisceau ancré dans une structure protéique associée à la constriction primaire des chromosomes et que nous allons décrire dans le paragraphe qui suit.

## **B. Mouvement des chromosomes en mitose :**

Comme nous venons de le voir, la présence de chromatine facilite la formation du fuseau de division en assurant l'orientation parallèle des MTs. A son tour, le fuseau de division va jouer un rôle capital pour les chromosomes en leur servant de support au cours de leurs mouvements.

Comme nous l'avons vu, le contact MT/chromosomes peut être établi *via* les chromokinésines, sur toute la longueur de la chromatine condensée. Bien que nous ayons évoqué ces interactions dans le cadre de la formation du fuseau de division, il est nécessaire de garder à l'esprit que MTs et chromosomes peuvent être pris tour à tour comme référentiel : lors de la mise en jeu de la chromokinésine, les MTs se déplacent le long des chromosomes, mais si ces MTs sont ancrés aux pôles du fuseau de manière stable, alors ce sont les chromosomes qui sont mus le long des MTs. La contribution des bras des chromosomes à leur déplacement au cours de la prémétaphase semble néanmoins discrète. Une structure protéique paire, associée aux régions centromériques des chromosomes semble en revanche prépondérante dans les mouvements rapides des chromosomes intervenant juste après la NEB: le kinétochore.

### ***1. Structure du couple centromère/kinétochore :***

#### ***a) Le couple centromère/kinétochore chez *S. Cerevisiae* :***

Au sein de la levure bourgeonnante, la région des centromères n'est pas directement identifiable par les approches classiques de cytologie. La région centromérique consiste en une séquence de 125 pb, comprenant trois régions fonctionnelles conservées d'un chromosome à l'autre (**figure 22**, (Clarke et Carbon, 1980; Fitzgerald-Hayes *et al.*, 1982; Hieter *et al.*, 1985)).

La première région, notée CDEI consiste en une séquence de 8 pb liant le facteur Cbfl (centromere-binding factor 1, (Cai et Davis, 1990)). Bien que ces deux éléments puissent être supprimés sans altérer la survie des levures, Cbfl participe à la stabilité chromosomique.

CDEI est suivie du domaine CDEII, comportant de 78 à 86 pb. Sa séquence est riche en A+T (pour revue, voir (Cheeseman *et al.*, 2002)) mais ne présente pas de motif consensuel qui pourrait être commun à tous les centromères. Elle semble jouer un rôle d'espaceur entre CDEI et CDEIII, ainsi qu'une fonction structurale en liant un variant de l'histone H3, Cse4 (Stoler *et al.*, 1995), l'orthologue de la protéine de mammifère CENP-A. Cse4/CENP-A entre dans la constitution de nucléosomes spécifiques de la région centromérique *in vivo* (Meluh *et al.*, 1998).

CDEIII est la seule séquence essentielle (25 bp). La détermination du centromère repose quasi-exclusivement sur la boîte CDEIII puisqu'une mutation ponctuelle dans cette région suffit à abolir la fonction du centromère (Meluh *et al.*, 1998; Stoler *et al.*, 1995). CDEIII lie un complexe protéique noté CBF3, contenant au moins quatre sous-unités, Ncd10, Cep3, Ctf13 et Skp1 (Lechner et Carbon, 1991). Les quatre protéines sont essentielles pour la viabilité de la souche de levures ainsi que pour la liaison du complexe CBF3 à CDEIII (Doheny *et al.*, 1993).

Plusieurs protéines candidates semblent pouvoir assurer l'interaction entre un centromère et un MT et définir l'équivalent fonctionnel chez la levure du kinétochore des mammifères. Ainsi, la protéine centromérique Ndc10 peut lier les MTs et se localise non seulement au niveau du KT, mais aussi le long du fuseau (Goshima et Yanagida, 2000). Plusieurs types de protéines interagissant avec les MTs y ont également été localisées, comme Cin8p (moteur moléculaire), Stu2p (Kosco *et al.*, 2001), Bik1p (une +TIP, (Lin *et al.*, 2001)) et le complexe Dam1p/Duo1p (Cheeseman *et al.*, 2001; Janke *et al.*, 2002).

### ***b) Le couple centromère/kinétochore chez l'homme :***

#### *(1) Structure du centromère :*

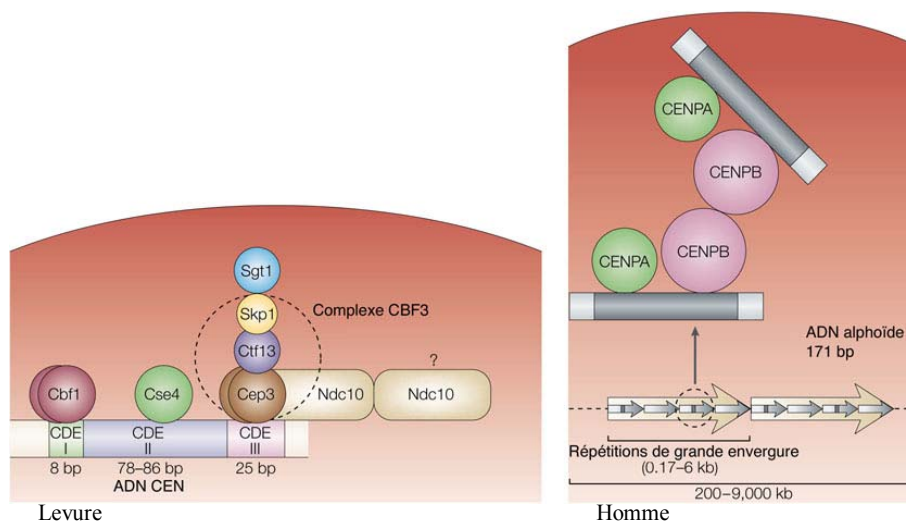
Au sein des cellules de mammifères, la région des centromères est directement identifiable par les approches classiques de cytologie : elle forme la constriction primaire des chromosomes mitotiques.

La base de la séquence centromérique humaine est un double motif de 2x171 pb, dont le nombre de copie varie entre 1500 et plus de 300000. Ces répétitions sont présentes au sein

de l'ADN  $\alpha$ -satellite ou ADN alphasatellite (Jackson *et al.*, 1993). Les motifs centromériques répétés des primates peuvent être subdivisés en deux catégories (**figure 22**, (He *et al.*, 1998)). La séquence des régions  $\alpha$ -I est très peu variable. Ses nucléosomes contiennent préférentiellement CENP-A (centromere protein A), en lieu et place de l'histone H3. Les régions  $\alpha$ -I se trouvent principalement en surface du chromosome (face "kinétochorienne", (Ando *et al.*, 2002)). A l'opposé, les nucléosomes des régions  $\alpha$ -II comportent principalement l'histone H3. Leur séquence est beaucoup plus variable que celle des régions  $\alpha$ -I. Elles forment le domaine central des centromères, où des protéines telles que les cohésines assurent l'association des chromatides sœurs.

Qui de la séquence centromérique ou de CENP-A spécifie le centromère ? La réponse provient de patients dont le chromosome 10 a été tronqué suite à une recombinaison interne, éliminant l'ADN  $\alpha$ -satellite. Dans ces conditions, une région dite **néo-centromérique** se forme, dont les nucléosomes sont porteurs de la protéine CENP-A. Ce néo-centromère demeure en place, tout au long des cycles de division successifs (Barry *et al.*, 1999; Saffery *et al.*, 2000; Tyler-Smith *et al.*, 1999). A l'inverse, l'inactivation de CENP-A provoque un défaut d'assemblage/localisation des KT's ainsi qu'un défaut de localisation des régions centromériques (Blower et Karpen, 2001; Howman *et al.*, 2000).

CENP-A semble être la protéine identifiant une portion de chromatine comme étant centromérique, et comme le point d'ancrage de la structure protéique associée : le kinétochore.



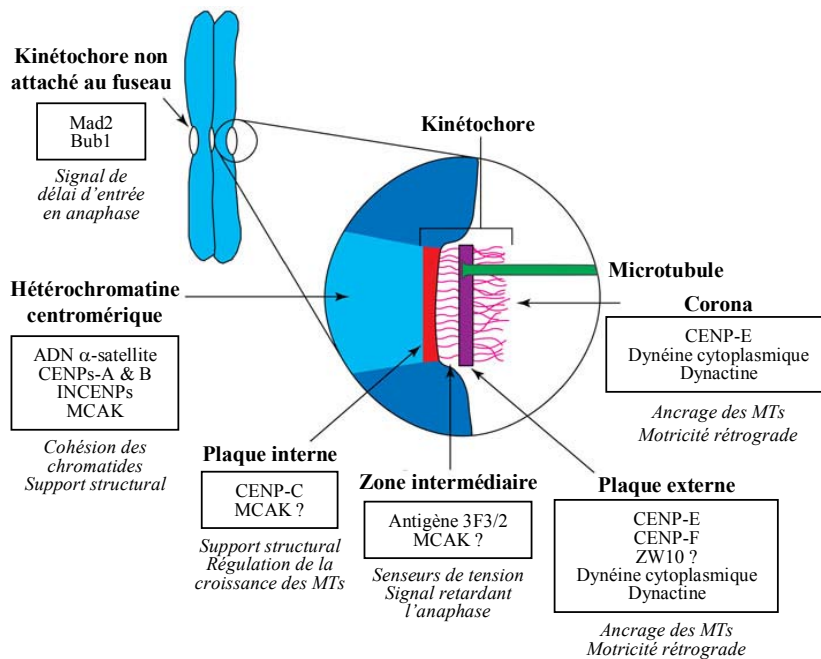
**Figure 22** : Structure des régions centromériques : comparatif *Saccharomyces Cerevisiae/Homo Sapiens*.

D'après (Kitagawa et Hieter, 2001).

(2) Structure du kinétochore :

**Morphologie du kinétochore :**

Le KT des cellules de mammifères est une construction protéique complexe, associée aux régions centromériques des chromosomes (**figure 23**). Lorsqu'il est visualisé par microscopie électronique, il apparaît constitué de quatre domaines, que l'on peut différencier par leur différence d'opacité aux électrons. Le domaine du KT immédiatement associée à la chromatine est nommée **plaque interne**. Elle est dense aux électrons et présente une épaisseur de 20 à 40 nm. La **plaque externe** (35-40 nm d'épaisseur, dense aux électrons) est séparée de la plaque interne par la **plaque intermédiaire** (15-35 nm d'épaisseur) qui apparaît translucide aux électrons. Le terme de **corona** désigne l'extension filamenteuse émanant de la plaque externe (filaments de 100 à 300 nm). Suivant les organismes considérés, le KT apparaît sous la forme d'une structure multi-laminaire discoïde, dont le diamètre varie entre 100 et 500 nm, capable d'interagir avec 10 à 45 MTs (pour revues, voir (Rieder, 1982)).



**Figure 23 :**

Structure des kinétochores. Localisation de ses constituants.

D'après (Rieder et Salmon, 1998).

L'étude des constituants permet de les classer en trois groupes que nous allons à présent passer en revue.

**Constituants structuraux :**

Le premier groupe se compose de protéines de structure telles que les protéines CENPs. Nous avons vu précédemment le rôle de la protéine CENP-A dans l'identification de la zone chromatinienne centromérique. Les protéines CENP-B et CENP-C, localisées



respectivement au niveau de la chromatine et de la plaque interne semblent avoir un rôle dans l'organisation structurale du lien centromère/KT.

***Le kinétochore, siège du contrôle de la transition métaphase/anaphase :***

Le second groupe inclut l'ensemble des protéines impliquées dans le point de contrôle métaphase/anaphase. En effet, afin d'assurer la répartition conforme de l'information génétique entre les deux cellules filles, chaque chromosome doit acquérir la bi-orientation. Ce terme désigne l'interaction de chacun des deux KT avec les MTs émergeant du pôle qui lui fait face. Par vidéomicroscopie, Conly Rieder a corrélé l'attachement du dernier kinétochore au fuseau de division à l'initiation de l'anaphase, survenant en moyenne 20 minutes après (Rieder *et al.*, 1994). En maintenant un KT méiotique détaché du fuseau de division par micromanipulation, on est capable de différer indéfiniment l'entrée des cellules en anaphase (Li et Nicklas, 1995). Si le dernier KT libre semblait être la source du signal retardant l'entrée en anaphase, ce sont les résultats obtenus par micro-ablation qui l'ont définitivement démontré. Après micro-ablation au laser du dernier KT libre, un délai de 15 minutes précède le départ des cellules en anaphase (Rieder *et al.*, 1995).

La nature de ce signal de délai à l'entrée en anaphase a été initialement l'objet d'investigations menées chez la levure, identifiant sept membres conservés du point de contrôle mitotique : Mad1 à 3 (mitotic arrest defective, (Li et Murray, 1991)), Bud1 à 3 (budding uninhibited by benomyl, (Hoyt *et al.*, 1991)) et Mps1, une kinase requise pour le contrôle de la duplication des SPBs (Weiss et Winey, 1996). Tous présentent un orthologue chez les vertébrés (à l'exception de Bub2) dont le nom est identique à celui donné chez la levure, à l'exception de Mad3 : BubR1 (Abrieu *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1996; Taylor *et al.*, 1998; Taylor et McKeon, 1997). Ces protéines sont présentes sur les KT non associés aux MTs du fuseau.

La nature des interactions liant les différents constituants du point de contrôle mitotique n'est qu'en partie connue. Néanmoins les auteurs s'accordent sur un modèle d'action de ces protéines. Mad2 est recrutée aux KT (non associés au fuseau) sous une forme complexée à Mad1 (Chen *et al.*, 1998). Mad2 est constamment en équilibre entre sa forme liée au KT et sa forme soluble. Sa demi-vie sur cette structure étant de l'ordre de 25 secondes, le passage au KT pourrait être un moyen d'activer Mad2 en tant que messenger diffusible de délai d'entrée en anaphase (Howell *et al.*, 2000).

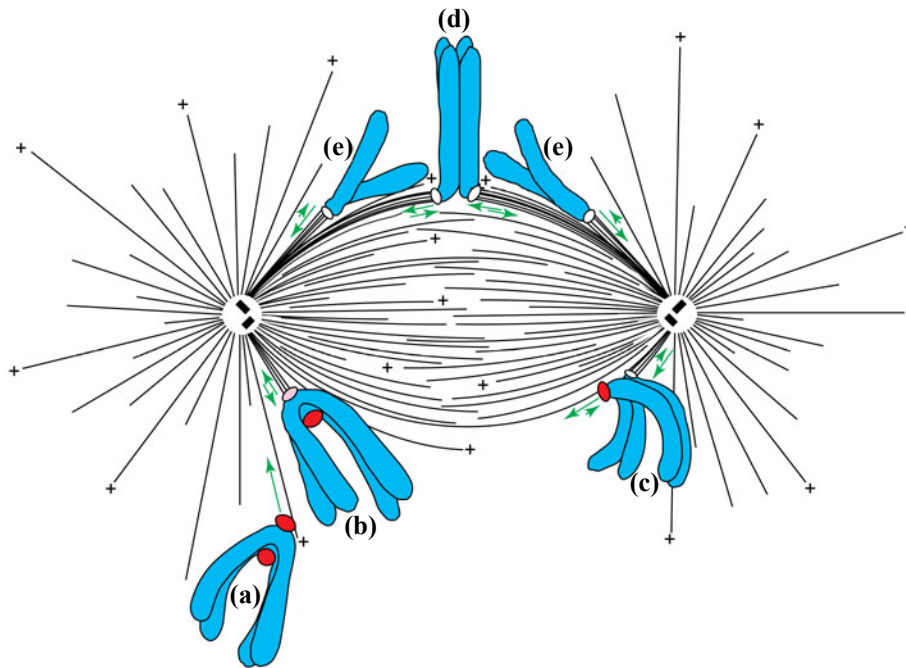
La microinjection d'anticorps dirigés contre Mad2 entraîne sa délocalisation des KT, ainsi que l'entrée précoce des cellules en anaphase, occasionnant une mauvaise ségrégation des chromosomes (Gorbsky *et al.*, 1998). Ce phénotype laissait entrevoir que la présence de Mad2 aux KT pourrait constituer un bon marqueur de l'activation du "checkpoint" mitotique. Néanmoins, l'inhibition du complexe ZW10/Rod (Zest white 10/ Rough deal) localisé aux KT est capable de provoquer l'inactivation du point de contrôle sans que Mad2 disparaisse de ces structures (Chan *et al.*, 2000). ZW10 est capable d'interagir avec la p50/dynamitine (Starr *et al.*, 1998) et est le récepteur supposé du complexe dynéine/dynactine aux KT. Ce complexe moteur est responsable du départ de Mad2 du KT vers les pôles après la formation de la fibre kinétochorienne (fibre K, voir plus bas, (Howell *et al.*, 2001)). Ces données indiquent que l'inactivation du point de contrôle métaphase/anaphase est indépendante de la délocalisation des protagonistes protéiques associés aux KT.

APC/C est une E3 ubiquitine ligase, responsable de la modification de cycline B induisant sa dégradation par le protéasome, marquant l'entrée en anaphase (Raff *et al.*, 2002). Elle est également responsable de la dégradation des protéines assurant la cohésion des chromatides sœurs (pour revue, voir (Nasmyth, 1999)). *In vitro*, un complexe tétramérique a pu être isolé, contenant Mad2, BubR1, cdc20 et APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome, (Fang *et al.*, 1998)). *In vivo*, un tel complexe existe, et est capable d'inhiber spécifiquement APC/C mitotique (Sudakin *et al.*, 2001). Le passage transitoire de ces constituants à la surface du KT non attaché au fuseau pourrait permettre l'activation de l'assemblage du complexe inhibiteur d'APC/C.

#### ***Le kinétochore, siège d'interactions chromosomes/microtubules :***

Le dernier groupe contient les protéines capables de s'associer aux MTs : des moteurs moléculaires ainsi que des régulateurs de la dynamique instable des MTs. Nous allons à présent voir leur implication dans le mouvement des KT et la formation de la fibre K.

## 2. Le mouvement des chromosomes :



**Figure 24 :**

Comportement des chromosomes au cours de la mitose.

(a) Le chromosome capture latéralement un MT *via* son kinétochore et initie un mouvement rapide vers le pôle. (b) Des MT vont s'insérer au niveau du kinétochore faisant face au pôle tandis que des MT issus du pôle opposé contactent son kinétochore frère (c). Le chromosome ainsi bi-orienté se dirige vers l'équateur du fuseau où aura lieu la séparation des chromatides sœurs (e).

D'après (Rieder et Salmon, 1998).

Au début des années 1990, plusieurs équipes se sont attelées à la description des mouvements des chromosomes et à leurs interactions avec le fuseau de division.

### **a) Interaction initiale tangentielle et mouvement rapide :**

Le KT constitue le site de la première interaction, tangentielle du chromosome avec les MT (Merdes et De Mey, 1990; Rieder et Alexander, 1990). Suite à cette interaction, il glisse rapidement (25-55 $\mu\text{m}/\text{min}$ ) en direction du pôle dont est issu le MT auquel il est associé. Plusieurs activités motrices opposées ont été mise en évidence au niveau du KT (Hyman et Mitchison, 1991). Cependant, les caractéristiques de ce mouvement rapide (vitesse et direction) suggèrent que le complexe moteur MT-dépendant D/D prend en charge le déplacement. A proximité du pôle, des MT s'insèrent progressivement dans la plaque kinétochorienne par leur extrémité la plus dynamique et forment la fibre K (McEwen *et al.*, 1997). A mesure que cette insertion a lieu, la corona disparaît. Le complexe D/D qui y était localisé est relargué du KT (Dujardin *et al.*, 1998).

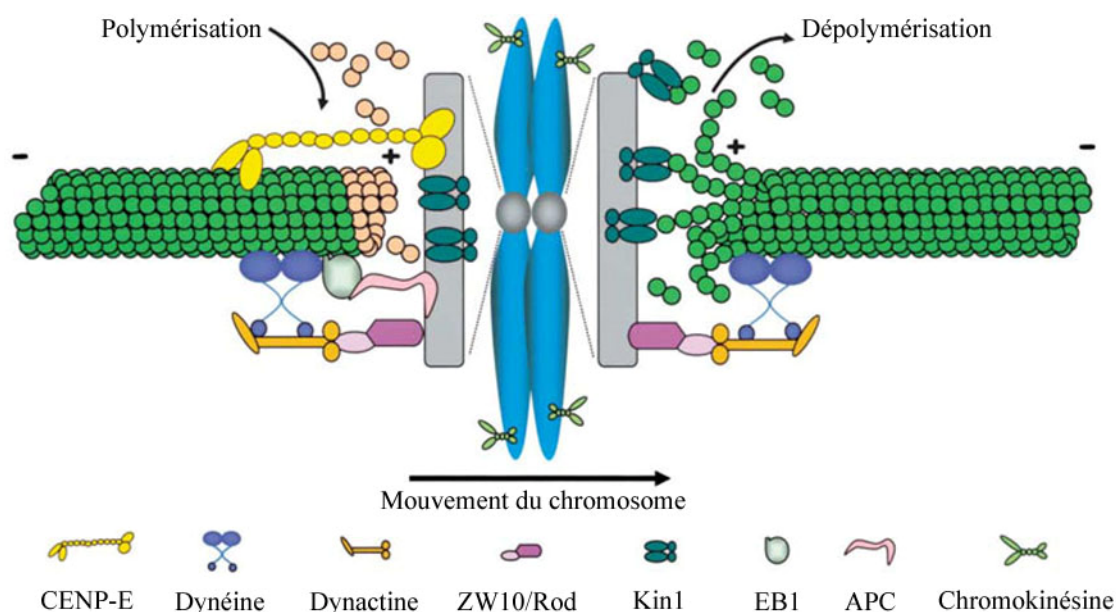
**b) Forces d'éjection polaire et congression :**

Suite au mouvement rapide du chromosome en direction du pôle, deux types de forces vont s'opposer : les forces exercées sur le chromosome le déplaçant en direction du pôle (P, toward the pôle) et celles visant au contraire à l'éloigner du pôle (AP, away from the pôle). L'alternance entre les mouvements AP et P génère une oscillation du chromosome **mono-orienté** (un seul KT associé à un pôle du fuseau) à proximité de son pôle d'attache. Le chromosome reste mono-orienté jusqu'à l'interaction du second KT avec des MTs provenant du pôle opposé. Une seconde fibre K se forme, issue du pôle opposé et à destination du second KT. Il entame alors un mouvement vers la plaque métaphasique : on parle de **congression**. Une fois aligné, le chromosome oscille autour d'une position médiane.

Si la survenue des mouvements AP peut coïncider avec l'établissement d'un contact entre le KT frère et les MTs du pôle opposé, de tels phénomènes sont également visibles en absence d'initiation de la **bi-orientation** ou lorsque les chromatides sœurs bi-orientées sont dissociées par microdissection laser (Khodjakov *et al.*, 1997; Tippit *et al.*, 1980). La forte densité de MTs présents aux pôles laissait présager que les mouvements AP étaient générés par les impacts répétés des MTs en cours de croissance sur la surface des chromosomes (Houchmandzadeh *et al.*, 1997; Rieder *et al.*, 1986). Cependant, la présence de moteurs (+) sur les bras des chromosomes a permis de postuler un modèle alternatif de génération des "**forces d'éjection polaire**". L'un de ces moteurs, Xklp1 semblait être le candidat idéal pour une telle fonction, puisqu'il est responsable d'une interaction entre les bras des chromosomes et les MTs. Néanmoins, comme nous l'avons vu précédemment, sa fonction semble se limiter à l'organisation d'un réseau parallèle de MTs et à sa stabilisation aux abords du chromosome (Vernos *et al.*, 1995; Walczak *et al.*, 1998). Une seconde protéine apparentée aux kinésines a été localisée le long des bras des chromosomes mitotiques. Xkid (*xenopus* kinesin-like DNA-binding protein, (Antonio *et al.*, 2000; Funabiki et Murray, 2000)) ne semble pas avoir d'influence sur la formation/maintien du fuseau de division. En revanche, elle semble participer de manière prépondérante aux mouvements AP des chromosomes. Xkid est spécifiquement dégradée par une voie impliquant son ubiquitination en métaphase. Cette dégradation est nécessaire à l'initiation de l'anaphase. La restriction de la fonction de Xkid à la prémétaphase constitue un argument supplémentaire privilégiant l'hypothèse de son fonctionnement en tant que moteur responsable des forces d'éjection polaire.

**c) Maintenir la bi-orientation pendant la congression :**

Au cours de la congression, le chromosome bi-orienté se déplace en direction du plan équatorial de la cellule, tout en maintenant le contact entre chacun de ses KT et les pôles du fuseau. Ceci implique que le KT initiant un mouvement en direction de son pôle d'attache voit les MTs de sa fibre K dépolymériser. De manière coordonnée, le second KT engage un mouvement AP et les MTs de sa fibre K polymérisent (**figure 25**).



**Figure 25 :**

Capture des MTs par les kinétochores et congression des chromosomes.

Le complexe moteur D/D ancré aux KT*s* via ZW10/Rod participe avec CENP-E à la capture des MTs. Kin1 participe à la dépolymérisation des MTs pendant le mouvement P du chromosome. Le complexe EB1/APC maintient le lien KT/MT aux KT*s*. Les forces d'éjection polaires sont générées par la chromokinésine, localisée sur les bras des chromosomes.

D'après (Cleveland *et al.*, 2003).

Bien que le mécanisme moléculaire synchronisant les deux KT*s* au cours de la congression reste à déterminer, deux moteurs moléculaires semblent impliqués.

Le moteur (+) CENP-E est doublement impliqué dans le maintien de la bi-orientation au cours de la congression (**figure 25**). Son premier rôle est celui d'un moteur moléculaire impliqué dans le mouvement AP. En effet, l'inhibition de sa fonction *in vivo* (Putkey *et al.*, 2002; Schaar *et al.*, 1997) ou *in vitro* (Wood *et al.*, 1997) empêche la congression. Par ailleurs, CENP-E participe au maintien de l'interaction KT/fibre K pendant la dépolymérisation de cette dernière (Lombillo *et al.*, 1995). CENP-E pourrait également participer à la stabilisation de la fibre K : la microinjection d'anticorps dirigés contre son domaine moteur diminue le nombre de MTs kinétochoriens (McEwen *et al.*, 2001).

La perte de dimères de tubulines au niveau du KT pourrait être le fruit de l'activité d'un autre type de moteurs moléculaire, appartenant à la famille Kin I. En effet, les moteurs XKCM1 chez le xénope (Walczak *et al.*, 1996) et MCAK chez le mammifère (Wordeman et Mitchison, 1995) utilisent le cycle ATPasique de leur domaine moteur afin de promouvoir la dépolymérisation des MTs. Richard McIntosh qualifie ces protéines d'"endotubulases" (pour revue, voir (McIntosh *et al.*, 2002)). Leur localisation aux KTs suggère un rôle dans la composante P du mouvement de congression. Néanmoins, l'utilisation d'un dominant-négatif du moteur suggère que MCAK n'est pas essentiel au cours de la prémétaphase mais capital en anaphase (Maney *et al.*, 1998).

## **C. Quelle fonction pour les +TIPs en mitose ?**

Comme nous l'avons vu, en interphase les +TIPs se localisent au bout des MTs en cours de polymérisation. Cette localisation préférentielle leur permet dans certaines situations de participer au mécanisme de recherche/capture exercé par les MTs à destination d'organites. Le kinétochore peut être considéré comme l'un de ces organites ayant à subir un transport MT-dépendant. Alors que nous évoquons le problème de l'établissement et du maintien de la bi-orientation, il apparaît légitime de s'interroger sur le rôle de telles protéines en mitose.

### ***1. Le couple dynéine/dynactine :***

Le moteur dynéine peut être localisé sur les KTs (Pfarr *et al.*, 1990) non encore associés aux MTs du fuseau de division (Echeverri *et al.*, 1996) : cette localisation est indépendante de la présence des MTs. La surexpression de la p50/dynamitine délocalise la dynéine du KT, impliquant l'activateur dans son adressage sur cette structure (Echeverri *et al.*, 1996). Dans ces conditions, les auteurs ont observé une augmentation de la proportion de cellules en prémétaphase, suggérant un dysfonctionnement de l'interaction KT/MT ou du mouvement rapide, supposé D/D dépendant. Néanmoins, ce type d'approche touche l'ensemble des fonctions jouées par le moteur, aussi bien en interphase (localisation périnucléaire de l'appareil de Golgi.) qu'en mitose (absence de séparation des pôles du fuseau) rendant l'interprétation du phénotype difficile.

L'effet pléiotropique de la surexpression de la p50 peut être contourné en interférant avec l'adressage spécifique du complexe D/D à la structure d'intérêt. A l'occasion d'un crible double-hybride, une interaction a été mise en évidence entre ZW10 (Zest-White 10, (Starr *et al.*, 1997)) et la p50 (Starr *et al.*, 1998). De plus, des mutations de gène DmZW10 réalisées

chez la drosophile abolissent l'adressage du complexe D/D au KT. La dépendance d'adressage suggère que ZW10 est le récepteur du complexe au KT chez *Drosophila melanogaster*. Les immunolocalisations de l'orthologue humain de ZW10, réalisées sur cellules HeLa mettent en évidence un patron de localisation identique à celui observé chez la mouche du vinaigre (Starr *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 1992). L'adressage de ZW10 au KT est étroitement lié à son interaction avec l'un de ses partenaires, ROD (Scaerou *et al.*, 2001; Starr *et al.*, 1998). La disruption du gène codant ZW10 et/ou ROD provoque un phénotype identique, tant chez *Drosophila melanogaster* que chez *Cænorabditis elegans*. Il peut être subdivisé en deux classes d'effets. La première affecte la ploïdie de la cellule. En anaphase, on note que de nombreuses chromatides sœurs restent à l'équateur de la cellule, leurs KTs n'étant pas associés au fuseau de division (Starr *et al.*, 1998). La seconde porte sur le point de contrôle métaphasique. Dans le cas de simples ou doubles mutants ZW10/ROD, le point de contrôle est inactivé, conduisant à une entrée précoce des cellules en anaphase.

Quelque soit le moyen employé pour tenter de perturber la fonction du complexe D/D aux KT, il semble qu'il en résulte un effet pléiotropique, conséquence de la perturbation de plusieurs processus cellulaires. La fonction du complexe D/D dans le mouvement rapide des KTs en prémétaphase reste donc à vérifier. En revanche, son implication dans le transport le long de la fibre K, et en direction des pôles, de protagonistes du point de contrôle métaphase/anaphase est une fonction avérée. En effet, il a été démontré que Mad2 et Rod subissent un tel transport, dont la signification biologique reste à définir (Howell *et al.*, 2001; Wojcik *et al.*, 2001).

A partir de la prémétaphase, le complexe D/D s'accumule le long des MTs astériens ainsi que sous forme d'accumulations juxtamembranaires situées en regard des pôles du fuseau, en dessous des jonctions serrées : les sites corticaux (Busson *et al.*, 1998). Par analogie avec les mécanismes observés chez *S. cerevisiæ*, les auteurs ont postulé une implication des interactions MTs astériens/sites corticaux dans le positionnement du fuseau de division (pour revue, voir (Dujardin et Vallee, 2002)).

## **2. Le couple EB1/APC :**

Le terme de "couple" EB1/APC en mitose est en réalité assez peu approprié. En effet, il semble que leur interaction soit diminuée suite à la phosphorylation d'APC par la p34<sup>cdc2</sup> (Askham *et al.*, 2000; Trzepacz *et al.*, 1997).

APC est présente sur les KT's associés aux MT's des cellules HeLa et PtK, depuis la NEB jusqu'en métaphase. La localisation d'APC couvre le KT et l'émergence de la fibre K associée (Fodde *et al.*, 2001; Kaplan *et al.*, 2001). Cet adressage d'APC est directement dépendant des MT's, puisque l'utilisation du nocodazole suffit à l'abolir. L'étude du caryotype de cellules porteuses d'une forme tronquée d'APC dépourvue du site de liaison aux MT's et à EB1, révèle une augmentation du nombre moyen de chromosomes par cellules. APC pourrait être impliquée dans le maintien de la ploïdie. Néanmoins, le phénotype constaté n'implique par défaut du point de contrôle métaphase/anaphase. Les auteurs ont naturellement émis l'hypothèse d'une intervention d'APC dans la stabilisation et l'ancrage des MT's de la fibre K.

En mitose, EB1 semble adopter une localisation comparable à celle qu'elle occupe en interphase : elle se comporte comme une +TIP, se distribuant de manière dynamique aux bouts (+) de l'ensemble des MT's du fuseau de division (Berrueta *et al.*, 1998; Morrison *et al.*, 1998; Tirnauer *et al.*, 2002a). Elle se localise également aux KT's pendant le mouvement AP, correspondant à une phase de polymérisation des MT's de la fibre K, tout au long de la mitose. Bien qu'EB1 soit capable d'interagir avec le complexe D/D (Berrueta *et al.*, 1999), son adressage aux KT's en est indépendant, comme démontré dans le cadre d'expériences de surexpression de la p50/dynamitine (Tirnauer *et al.*, 2002a). Le rôle d'EB1 aux KT's reste à déterminer. Les auteurs envisagent trois possibilités. La première considère APC au KT comme le récepteur d'EB1 (**figure 25**). EB1 en tant que +TIP utilise la dynamique des MT's comme un moyen de sonder l'espace intracellulaire à la recherche de son point d'ancrage kinétochorien, APC. Néanmoins, comme nous l'avons évoqué, l'interaction EB1/APC est fortement diminuée en mitose, rendant cette hypothèse peu probable. Un second modèle, implique le couple EB1/APC dans la stabilisation de la fibre K. On sait d'après les expériences menées *in vitro*, que l'association des deux protéines promeut leur activité stabilisatrice des MT's (Nakamura *et al.*, 2001). Pour les mêmes raisons que celles évoquées plus haut, ce modèle est peu probable. Enfin, EB1 pourrait simplement servir de marqueur de bouts (+), permettant leur capture et leur stabilisation par d'autres facteurs aux KT's.

*Les localisations d'APC et d'EB1 étant relativement récentes, la fonction de ces deux protéines, voire du couple, reste à définir...*

### **3. La CLIP-170 :**

En mitose, la CLIP-170 se localise sur les KT's prémétaphasiques non associés au fuseau de division (Dujardin *et al.*, 1998). Le traitement de cellules HeLa à la vinblastine a



permis de démontrer que sa localisation à la corona ne dépend pas des MTs (De Mey *et al.*, 1995). En revanche, la surexpression de la p50 induit une délocalisation de la CLIP-170 des KTs, impliquant le complexe D/D dans son adressage. L'utilisation de constructions codant pour des formes tronquées de la CLIP-170 a permis d'établir que son domaine carboxy-terminal, contenant les deux motifs en "doigt de zinc", est nécessaire à l'adressage. Il est à noter que Bik1p a été décrite comme se localisant aux KTs de la levure bourgeonnante, son adressage mettant en jeu son unique boîte CCHC (Lin *et al.*, 2001). Compte tenu des données d'adressage obtenues en interphase (Hoogenraad *et al.*, 2002; Valetti *et al.*, 1999), les motifs CCHC de la CLIP-170 pourraient être à l'origine de son interaction avec le complexe D/D. Cependant, la hiérarchie de recrutement de la CLIP-170 aux KTs serait inversée par rapport à celle du complexe D/D aux bouts (+) des MTs interphasiques.

Il est assez frappant de constater que la CLIP-170 et le complexe D/D se codistribuent une fois de plus sur un cargo en attente de transport. Le KT peut être conçu comme un organite nécessitant un chargement sur les MTs qui pourrait être médié par la CLIP-170. D'après le modèle de Janet Rickard, le moteur D/D pourrait prendre en charge le glissement rapide du KT le long d'un MT (Rickard et Kreis, 1996). Les paramètres du mouvement observé (vitesse et directionnalités) sont compatibles avec cette hypothèse. D'autre part, la surexpression de formes dominant-négatif de la CLIP-170, dépourvues de ses deux CAP-Gly provoque une augmentation de la proportion de cellules en prémétaphase, corrélée à une augmentation de l'indice mitotique (Dujardin *et al.*, 1998). Dans le modèle évoqué plus haut, la CLIP-170 peut être conçue comme un facteur facilitant la capture tangentielle des MTs par le KT. Perturber son fonctionnement revient à diminuer la probabilité d'interaction KT/MT et ainsi à retarder le déroulement de la mitose. Cette hypothèse semble confirmée par les données obtenues pour l'orthologue de la CLIP-170 chez *S. cerevisiae*. Bik1p fait partie intégrante du KT de la levure. Elle assure l'interaction avec les MTs et permet maintient les régions centromériques des chromatides sœurs séparées jusqu'en anaphase (Lin *et al.*, 2001).

# *Résultats*

---

## Résultats

### I. Avant-propos :

Si la connaissance de la structure et de la localisation de la CLIP-170 ont évolué de manière prodigieuse ces dernières années, sa fonction n'est restée pas moins une énigme. La CLIP-170 se présente tour à tour comme une CLIP et une +TIP dont le fonctionnement et l'adressage sont toujours étroitement liés au complexe moteur dynéine/dynactine. Comme d'autres, nous avons entrepris de mettre en évidence un lien physique entre les deux protagonistes. Les lignes qui suivent explicitent les raisonnements suivis.

#### A. CLIP-170 et complexe D/D colocalisent partiellement :

La CLIP-170 est par définition une protéine de lien cytoplasmique (CLIP). Son organisation bipolaire lui permet d'interagir à la fois avec un cargo et les MTs. Initialement, le cargo identifié dans le laboratoire de Thomas Kreis était la vésicule d'endocytose (Pierre *et al.*, 1992). Ces données fonctionnelles *in vitro* demeurent à être démontrées *in vivo*. Néanmoins, les auteurs ont postulé une implication de la CLIP-170 dans l'initiation du mouvement D/D dépendant de vésicules (Rickard et Kreis, 1996). La CLIP-170, en maintenant le lien statique vésicule/MT permettrait le chargement du moteur sur ce même MT.

Le fonctionnement de concert de la CLIP-170 et du complexe D/D implique que les protagonistes puissent être mis en évidence sur les mêmes structures. Jusqu'à la publication des travaux du laboratoire, trois sites de co-localisation entre la CLIP-170 et le complexe dynéine/dynactine avaient été identifiés.

Deux d'entre eux sont des cargos ayant à subir un transport rétrograde : les vésicules d'endocytose (Lacey et Haimo, 1992; Pierre *et al.*, 1992) et les KTs (Dujardin *et al.*, 1998). Faute de données, on ne connaît pas la hiérarchie d'adressage de la CLIP-170 et du complexe D/D sur les vésicules d'endocytose. En revanche, l'intégrité du complexe D/D est un pré-requis à l'adressage de la CLIP-170 sur les KTs prémétaphasiques (Dujardin *et al.*, 1998). Cette localisation requiert que son domaine carboxy-terminal soit intact. Ce résultat semble indiquer que ses deux motifs en doigt de zinc pourraient être impliqués dans une interaction directe ou indirecte avec les composants du complexe D/D. Les données publiées du

laboratoire font état d'un délai du processus menant à la bi-orientation des chromosomes, dans un contexte où une CLIP-170 dépourvue de ses CAP-Gly est surexprimée. Néanmoins, le mécanisme par lequel la CLIP-170 tronquée prolonge la prémétaphase reste inconnu : interférence avec l'initiation de l'interaction tangentielle MT/KT ? avec le mouvement rapide P ? avec le mouvement de congression ?

Le troisième site de codistribution est le bout (+) des MTs. La CLIP-170 est le membre fondateur d'une nouvelle famille de protéines dites '+TIPs' (Schuyler et Pellman, 2001a). Le comportement dynamique de la CLIP-170 aux bouts (+), tel qu'il a été observé par vidéomicroscopie (Perez *et al.*, 1999) est commun à tous ses membres. Les +TIPs sont des protéines s'associant de manière dynamique à l'extrémité la plus dynamique des MTs polymérisant. Elles recouvrent partiellement le MT, définissant une sorte de "comète" terminale. Plusieurs sous-unités du complexe D/D ont été localisées aux bouts (+) sur cellules fixées : p150<sup>Glued</sup>, p50, Arp1 et la DIC (Vaughan *et al.*, 1999). Néanmoins, la définition des +TIPs inclut la notion de comportement dynamique. A ce jour cette dernière caractéristique n'a été établie que pour la p150<sup>Glued</sup> (Vaughan *et al.*, 2002). Les résultats obtenus pour l'orthologue NudA de la DHC chez *Aspergillus nidulans* (Xiang *et al.*, 2000) suggèrent que cette sous-unité se comporte comme une +TIP mais il reste à en apporter la preuve chez le mammifère. Compte tenu de la dépendance d'adressage qu'il existe entre la CLIP-170 et le complexe D/D aux KT's, les auteurs ont abordé ce point en s'attachant aux bouts (+) des MTs. Il s'avère que la dépendance d'adressage est inversée par rapport aux KT's, puisque le complexe D/D ne peut s'adresser aux bouts (+) en présence d'une CLIP-170 dépourvue de son domaine carboxy-terminal (Valetti *et al.*, 1999). En dépit de ces données, il semblerait que p150<sup>Glued</sup> puisse s'associer aux MTs (Vaughan *et al.*, 2002). Néanmoins, ces données ayant été obtenues dans le cadre d'une surexpression de la protéine, ce résultat est soumis à caution.

## **B. A la recherche d'un lien CLIP-170 / complexe D/D :**

Jusqu'à la publication de nos résultats, l'interaction entre la CLIP-170 et le complexe D/D avait toutes les caractéristiques de "l'Arlésienne". En dépit des données sur les dépendances d'adressage ainsi que sur leur codistribution, la preuve d'une interaction physique restait à apporter. Comme aucun groupe n'avait mis en évidence d'interaction directe, nous avons entrepris d'identifier un intermédiaire, sorte d'adaptateur entre la CLIP-170 et le complexe D/D. L'adaptateur doit se colocaliser avec les deux "partenaires". Par conséquent, il doit s'agir d'une +TIP et/ou d'une protéine capable de s'associer aux KT's. Toute

perturbation la concernant doit affecter l'adressage du couple D/D aux bouts (+) des MTs et celle de la CLIP-170 aux KTs.

L'hypothèse la plus évidente consistait à trouver un partenaire commun aux deux protagonistes. Néanmoins, vu la quasi-absence de partenaires identifiés pour la CLIP-170 et, au contraire, la profusion d'interactants du complexe moteur, nous avons entrepris la recherche de candidats au sein de la voie fonctionnelle Dyn1p identifiée chez la levure bourgeonnante. En 1997, John Geiser a identifié une famille de gènes requis pour la survie d'une souche de *Saccharomyces cerevisiae* dépourvue du gène CIN8. La protéine en résultant est une kinésine impliquée dans la séparation des SPBs. Les synthétiques létaux obtenus ont permis de définir la famille des gènes PAC (perish in the absence of CIN8), définissant une seconde voie fonctionnelle responsable de ce mécanisme (Geiser *et al.*, 1997). Parmi les mutants PAC, la plupart codent pour des sous-unités du complexe D/D. Les deux gènes PAC ne répondant pas à ce dernier critère sont PAC1 et PAC14 (également nommé BIK1) codant pour les orthologues respectifs de LIS1 et CLIP-170.

## **C. LIS1, un bon candidat :**

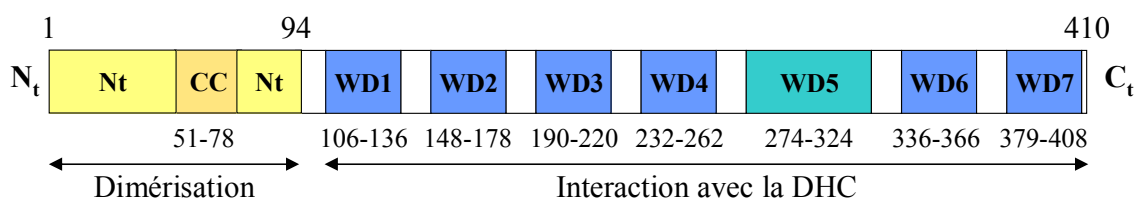
Le complexe D/D et la CLIP-170 sont des membres de la famille des +TIPs. Par voie de conséquence, la protéine servant d'intermédiaire entre les deux doit également en faire partie.

### ***1. NudF se comporte comme une +TIP :***

Les données obtenues chez *Aspergillus nidulans* ont permis d'identifier la famille des gènes NUD, impliqués dans le positionnement du noyau. Plusieurs de ses membres sont des sous-unités de la dynéine (voir l'introduction, (Beckwith *et al.*, 1998; Xiang *et al.*, 1994)). Les auteurs ont mis en évidence que NudF, l'orthologue de LIS1, est capable de se lier de manière dynamique aux bouts (+) des MTs polymérisant (Han *et al.*, 2001). L'utilisation d'une souche mutante thermosensible pour le gène NUDF a permis de montrer son implication dans le contrôle de la dynamique des MTs. En condition non permissive, l'absence de NudF fonctionnel est à l'origine d'une diminution des fréquences de catastrophe et de sauvetage, ainsi que de la vitesse de dépolymérisation. Une interaction directe entre NudF et NudA (orthologue de la DHC) a pu être mise en évidence par test double-hybride (Hoffmann *et al.*, 2001). NudF s'associe avec le premier domaine AAA de NudA, correspondant à la P1-loop.

## 2. LIS1, l'orthologue humain :

LIS1 a été initialement identifiée lors d'un crible PCR visant à isoler des ADNc contenant des répétitions proches de celles de la  $\beta$ -transducine. L'un des produits du crible correspond au produit d'un gène situé en position 17p13.3 du chromosome 17 humain (Reiner *et al.*, 1993). Il code pour la protéine LIS1, constituée de 411 résidus acides-aminés. La séquence primaire de la protéine peut être divisée en deux domaines fonctionnels.



**Figure R1 :**

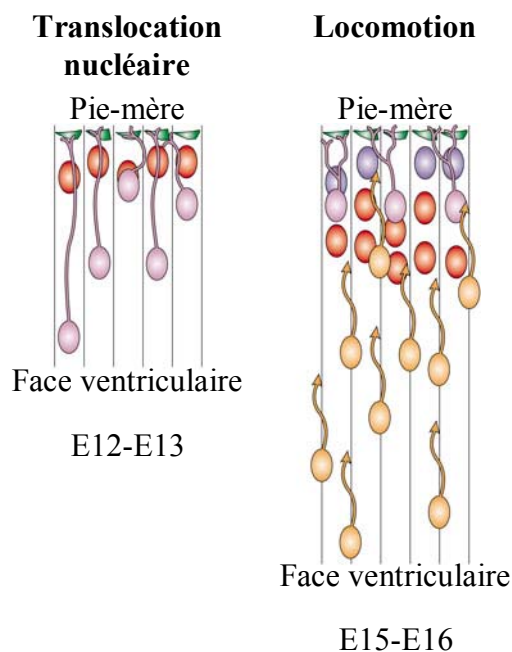
Schéma de la structure de LIS1.

Le domaine amino-terminal s'étend sur les 94 premiers résidus et est responsable de la dimérisation de la protéine (Cahana *et al.*, 2001). Bien qu'elle comporte un court domaine "coiled-coil", les 28 résidus le constituant ne sont pas essentiels à l'homodimérisation (Tai *et al.*, 2002). Le domaine carboxy-terminal comporte sept répétitions de type WD dont la répartition rappelle celle des sous-unités  $\beta$  des protéines G hétérotrimériques (Lambright *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 1995). L'équipe d'Orly Reiner a tenté de modéliser la structure des résidus 95-274 à partir des données de cristallographie disponibles. Néanmoins, la cinquième répétition du motif présente une insertion de 19 résidus acides-aminés originale qui a empêché les auteurs de modéliser la totalité du domaine carboxy-terminal (Sapir *et al.*, 1999b). Une délétion couvrant cette insertion est rencontrée chez certains patients atteints de lissencéphalie, une pathologie du développement du cortex cérébral que nous allons à présent aborder.

D'après les données quantitatives publiées, LIS1 est au moins quinze fois plus abondante dans le cerveau que dans les autres tissus (Smith *et al.*, 2000), impliquant une fonction préférentielle de la protéine au sein du système nerveux central. La région du chromosome 17 porteuse du gène LIS1 est justement trouvée comme une cible de microdélétion chez les patients atteints d'une forme de lissencéphalie de type 1, le syndrome de Miller-Dieker (Ledbetter *et al.*, 1992; Reiner *et al.*, 1993). Appelée également agyrie, la lissencéphalie est une malformation du cortex cérébral se caractérisant par l'absence de circonvolutions. Dans certains types de lissencéphalie, la surface cérébrale est complètement

lisse. Plusieurs syndromes présentent une lissencéphalie. Le syndrome de Miller-Dieker fait partie des lissencéphalies de type 1. Il provoque de nombreuses malformations, dont celles du visage. L'évolution de ce syndrome est variable. Pour les formes sévères, la survie de l'enfant est en général limitée à 1 ou 2 ans. Les formes moins sévères associent un retard mental, des difficultés à la marche et à l'apprentissage du langage ainsi qu'une épilepsie sévère. Le syndrome de Walker qui est appartient aux lissencéphalies de type 2 associe des anomalies de l'encéphale et des yeux touchant la cornée et la rétine. Son évolution est fatale en quelques semaines.

Le cortex cérébral est constitué de six couches de neurones. Elles se mettent en place progressivement, par la migration successive des neurones les constituant. La zone ventriculaire constitue le niveau de prolifération des neurones qui migrent vers la surface du cortex, au contact de la future pie-mère. Deux types de migrations ont été identifiés. Le premier consiste en une translocation du noyau du neurone, depuis la zone ventriculaire, en direction de la surface du cortex où est ancré le prolongement cellulaire. Au cours de la migration, le corps cellulaire situé en arrière du noyau se rétracte. Le second type de migration consiste en une locomotion guidée le long des cellules gliales joignant les deux surfaces opposées du cortex. Les deux types d'évènements se succèdent, la translocation nucléaire étant le phénomène dominant aux stades E12-E13 du développement embryonnaire de la souris, tandis que la locomotion l'est entre E14 et E15 (pour revue, voir (Gupta *et al.*, 2002)).



**Figure R2 :**

Deux modalités de déplacement pour les neurones du cortex cérébral.

La translocation nucléaire consiste en un déplacement intracellulaire du noyau depuis la face ventriculaire vers la surface (pie-mère) du cortex. Ce mode de déplacement est principalement observé aux stades E12-E13 du développement embryonnaire de la souris. La seconde modalité implique une locomotion de la cellule entière, le long de la glie radiaire. Elle intervient aux stades E15-E16.

D'après (Gupta *et al.*, 2002).

L'absence de circonvolutions observée chez les patients atteints du syndrome Miller-Dieker est la conséquence d'un défaut de la migration des neurones corticaux, visible par la désorganisation du cortex des patients. Le phénomène de translocation nucléaire évoqué pour les neurones corticaux semble proche du phénomène de nucléokinèse (déplacement du noyau) observé chez *Aspergillus nidulans*. Plusieurs revues ont d'ailleurs établi le parallèle entre les deux mécanismes (Morris, 2000a; Morris *et al.*, 1998a; Morris, 2000b).

### **3. Les liens entre LIS1 et le complexe dynéine/dynactine :**

L'interaction LIS1/dynéine est conservée au cours de l'évolution puisque LIS1 et DHC interagissent également chez le mammifère. Le domaine carboxy-terminal de LIS1 suffit pour sa liaison à la P1-loop de la DHC (Sasaki *et al.*, 2000), à la DIC et à la p50 (Sasaki *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2002). La DHC possède un second domaine d'interaction avec LIS1, recouvrant en partie celui responsable de la liaison aux LIC. Néanmoins, aucune compétition à l'interaction n'a pu être mise en évidence (Sasaki *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2002). Outre ces sous-unités, LIS1 a été montrée comme pouvant co-immunoprécipiter avec la p150<sup>Glued</sup>, Arp1 et p62 (Faulkner *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000). Ces résultats semblent indiquer que LIS1 n'interagit pas avec des sous-unités isolées, mais bien avec le complexe D/D.

D'un point de vue fonctionnel, LIS1 est une phosphoprotéine capable d'interagir avec les MTs (Sapir *et al.*, 1999a; Sapir *et al.*, 1997). *In vitro*, elle est capable d'induire la formation de MTs dont la longueur augmente avec la concentration de LIS1 présente dans le milieu réactionnel (Sapir *et al.*, 1997). Elle ne semble affecter ni la vitesse de polymérisation, ni celle de dépolymérisation, mais possède une activité anti-catastrophe. *In vivo*, en interphase, LIS1 se localise sur les MTs (Sapir *et al.*, 1997) ainsi qu'au centrosome, tant dans les cultures primaires de neurones que dans la lignée COS7 (Smith *et al.*, 2000). La localisation intracellulaire du complexe D/D semble être étroitement liée au dosage de LIS1. En effet, il apparaît que dans les cellules issues de souris Lis1<sup>+/-</sup> le complexe D/D adopte une position périphérique par rapport aux cellules de génotype Lis1<sup>+/+</sup> (Smith *et al.*, 2000). A l'inverse, les cellules issues de souris sauvages infectées par un virus porteur d'une copie additionnelle du gène codant pour LIS1 montrent une redistribution centrale du complexe D/D. Ce dernier résultat est également obtenu en surexprimant LIS1 au sein de cellules COS7. Parallèlement à ce phénotype, il apparaît que la position de l'appareil de Golgi est liée au dosage de LIS1. Alors qu'il est dispersé dans les cellules ne contenant que 50% de la protéine, il se concentre davantage en position péri-centrosomale lorsque le gène est surexprimé. Les



auteurs proposent une fonction de LIS1 dans la régulation et l'activation du moteur moléculaire. L'analyse par sédimentation sur gradient de saccharose met en évidence un recrutement des sous-unités libres p150<sup>Glued</sup> et DIC au sein du complexe 20 S lorsque LIS1 est surexprimée. Cette dernière observation constitue un argument supplémentaire, abondant dans le sens du postulat précédent.

En mitose, LIS1 se colocalise avec le complexe D/D aux KT's ainsi qu'aux sites corticaux (Busson *et al.*, 1998; Faulkner *et al.*, 2000). La localisation de LIS1 aux KT's semble diminuer au cours de la progression de la mitose, tout comme cela a été démontré pour le complexe D/D et la CLIP-170 (Dujardin *et al.*, 1998). De manière consistante avec notre hypothèse de travail, la surexpression de LIS1 provoque une diminution de la p150<sup>Glued</sup> aux bouts (+) des MT's en interphase, sans affecter celle de la CLIP-170. En mitose, LIS1 abolit le marquage p150<sup>Glued</sup> sur les sites corticaux ainsi que sur les MT's du fuseau. A l'inverse, dans ces conditions, la localisation kinétochorienne de la p150<sup>Glued</sup> reste inchangée. Tout comme la surexpression de formes tronquées de CLIP-170 incapables de lier les MT's, celle de LIS1 provoque une augmentation de la proportion de cellules prémétaphasiques (Dujardin *et al.*, 1998; Faulkner *et al.*, 2000). La surexpression de LIS1 est toutefois à l'origine d'un phénotype supplémentaire : elle provoque la formation de fuseaux multipolaires. La microinjection d'anticorps dirigés contre LIS1 génère en plus du délai en prémétaphase une perte de chromosomes, probablement due à l'instabilité de la bi-orientation après congression.

*Tout comme la CLIP-170, LIS1 agit de concert avec le complexe dynéine/dynactine. Perturber le fonctionnement de LIS1 permet d'obtenir des phénotypes qui se rapprochent de ceux obtenus en utilisant des formes tronquées de la CLIP-170. Les localisations et dépendances d'adressages de la CLIP-170 et de LIS1 sont proches si ce n'est similaires. Elles sont étroitement liées à la présence du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170. C'est pourquoi nous avons entrepris les expériences dont les résultats sont présentés dans la section suivante.*

## LIS1, CLIP-170's Key to the Dynein/Dynactin Pathway

Frédéric M. Coquelle,<sup>1</sup> Michal Caspi,<sup>2</sup> Fabrice P. Cordelières,<sup>1</sup> Jim P. Dompierre,<sup>1</sup> Denis L. Dujardin,<sup>1†</sup>  
Cynthia Koifman,<sup>2</sup> Patrick Martin,<sup>1</sup> Casper C. Hoogenraad,<sup>3</sup> Anna Akhmanova,<sup>3</sup> Niels Galjart,<sup>3</sup>  
Jan R. De Mey,<sup>1</sup> and Orly Reiner<sup>2\*</sup>

*Institut Curie, Section de Recherche, CNRS-UMR 146, Centre Universitaire d'Orsay, 91405 Orsay Cedex, France<sup>1</sup>; Department of Molecular Genetics, The Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot, Israel<sup>2</sup>; and Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus University, 3000 DR Rotterdam, The Netherlands<sup>3</sup>*

Received 10 October 2001/Returned for modification 7 December 2001/Accepted 15 January 2002

**CLIP-170 is a plus-end tracking protein which may act as an anticatastrophe factor. It has been proposed to mediate the association of dynein/dynactin to microtubule (MT) plus ends, and it also binds to kinetochores in a dynein/dynactin-dependent fashion, both via its C-terminal domain. This domain contains two zinc finger motifs (proximal and distal), which are hypothesized to mediate protein-protein interactions. LIS1, a protein implicated in brain development, acts in several processes mediated by the dynein/dynactin pathway by interacting with dynein and other proteins. Here we demonstrate colocalization and direct interaction between CLIP-170 and LIS1. In mammalian cells, LIS1 recruitment to kinetochores is dynein/dynactin dependent, and recruitment there of CLIP-170 is dependent on its site of binding to LIS1, located in the distal zinc finger motif. Overexpression of CLIP-170 results in a zinc finger-dependent localization of a phospho-LIS1 isoform and dynactin to MT bundles, raising the possibility that CLIP-170 and LIS1 regulate dynein/dynactin binding to MTs. This work suggests that LIS1 is a regulated adapter between CLIP-170 and cytoplasmic dynein at sites involved in cargo-MT loading, and/or in the control of MT dynamics.**

Several developmental and cellular processes require tightly controlled polarity signaling to the cytoskeleton. These processes include the migration of neurons during brain development (14), the establishment of apicobasolateral polarity of epithelial cells (83), and the positioning of mitotic spindles before the onset of anaphase (26). Central to this is the role of positional cues assembled at the actin-based cell cortex (65). These positional cues capture microtubules (MTs) and generate pulling forces on the centrioles and attached organelles. The molecular basis for MT capture at the cell cortex is still far from understood. Many proteins are thought to be involved in the process; among them are the MT-binding proteins CLIP-170 and LIS1.

**CLIP-170, cortical cues, and dynein-dynactin.** CLIP-170 was identified as an MT-binding protein that localized to a subset of MT distal ends (54). Subsequent experiments demonstrated that it is required for the binding of endocytic carrier vesicles to MTs in vitro (51). In living cells, it is found at MT plus ends (17), but it detaches when the MT stops growing (49). Genetic studies with budding and fission yeasts have also established that the CLIP-170 orthologs, Bik1p and tip1p, may act as an anticatastrophe factor at specific cellular sites, ensuring that the MTs reach the tip of the growing cell (4, 8). CLIP-170 belongs to a unique class of MT-binding proteins, recently termed +TIPS (for plus-end tracking proteins) (64). The closest homolog of CLIP-170 in mammals, CLIP-115 (16), is also a +TIP (1, 32). Like CLIP-170, CLIP-115 contains two MT

binding domains at its N terminus and a coiled-coil domain that mediates homodimerization (32, 62), but CLIP-115 lacks the unique C-terminal domain of CLIP-170, which displays two conserved zinc finger motifs (27). It remains unknown whether the latter are functionally important.

In addition to a potential role in the regulation of MT dynamics, the +TIPs may also function to recruit different proteins to the tips of growing MTs. For example, dynein/dynactin and adenomatous polyposis coli have been suggested to be targeted to MT tips by CLIP-170 (74) and EB1 (45), respectively. The positioning of the *Saccharomyces cerevisiae* mitotic spindle near the bud's neck and its migration into the bud involve interactions of cytoplasmic MTs with positional cues (48). The yeast homolog of EB1, Bim1p, is part of a kinesin-dependent pathway mediating positioning of the spindle near the bud's neck before anaphase (73). Bim1p interacts with Kar9p (44), a protein transported along actin cables to the bud cortex via an interaction with a type V myosin (reviewed in reference 37). This is so far the only elucidated molecular mechanism for tethering MTs to the cell cortex.

Genetic studies have suggested that the minus-end-directed MT motor dynein and its regulator, the dynactin complex, are also involved in MT capture at the cell cortex (7, 12). Dynein's known sites of action include cortical cues involved in centriole/nucleus rotations in *Caenorhabditis elegans* embryos (33, 69), spindle positioning in fruit fly oogenesis (42, 71), and mammalian epithelial cells (10). So far, the molecular mechanism of the dynein/dynactin-mediated MT tethering at cortical cues remains unknown. CLIP-170 may have an interesting role in this process, since it may tether cortex-associated dynein/dynactin to MTs, but so far attempts to demonstrate a physical interaction between these molecules have been unsuccessful.

**Kinetochores as positional cues.** A special example of a positional cue is the kinetochore, a pair of structures assem-

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Molecular Genetics, The Weizmann Institute of Science, 76100 Rehovot, Israel. Phone: 972 8 9342319. Fax: 972 8 9344108. E-mail: orly.reiner@weizmann.ac.il.

† Present address: Department of Pathology, Columbia University, New York, NY 10032-3702.

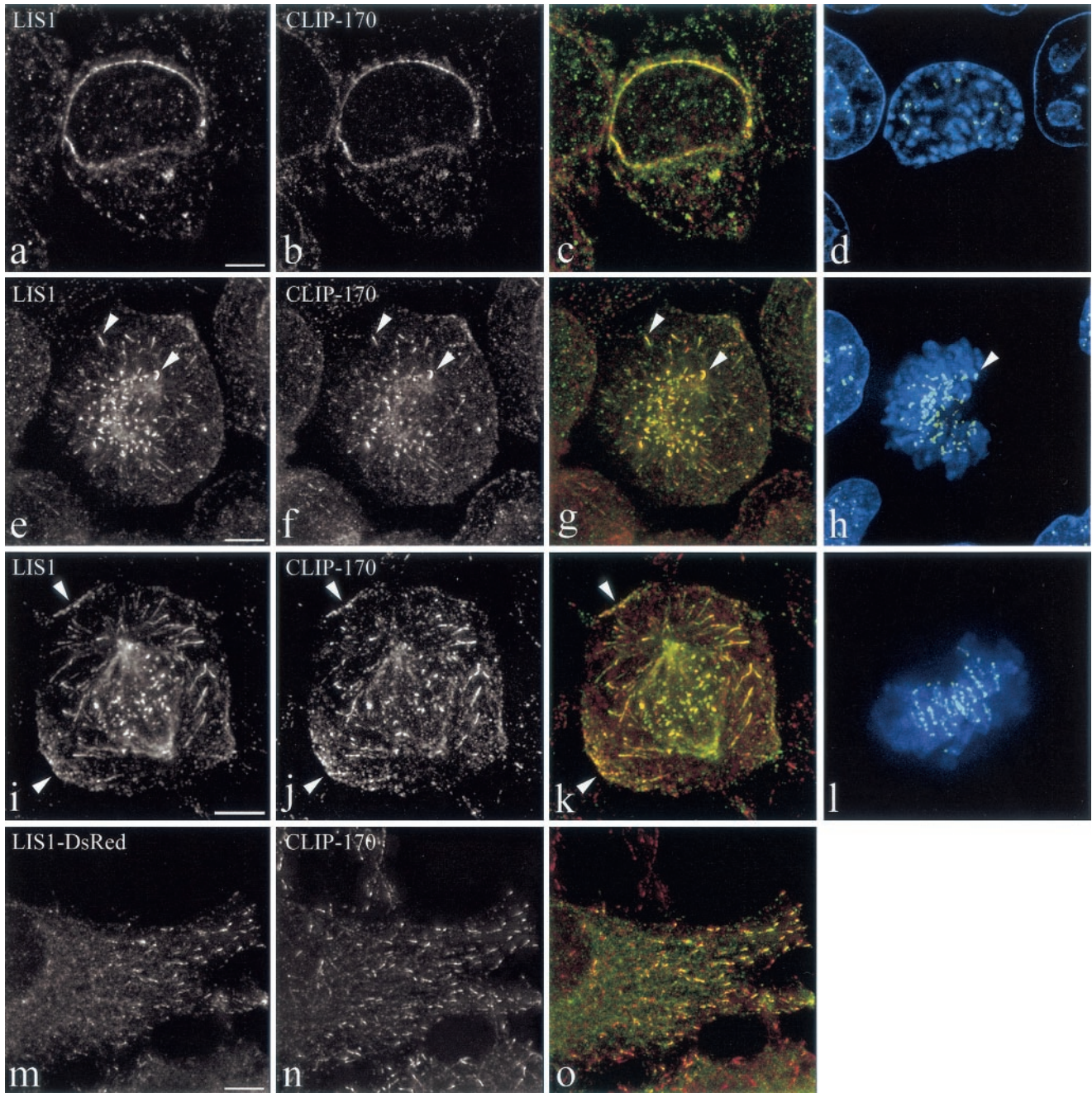


FIG. 1. Colocalization of LIS1 and CLIP-170 at MT-dependent and MT-independent sites. HeLa cells were labeled with a polyclonal anti-LIS1 antibody (a, e, and i), the monoclonal 4D3 anti-CLIP-170 antibody (b, f, and j), and CREST autoimmune serum. Panels c, g, and k are superimpositions of CLIP-170 (red) and LIS1 (green) signals. Panels d, h, and l are superimpositions of CREST (green) and DAPI signals. LIS1 and CLIP-170 colocalize on the nuclear envelope in prophase cells (a to d). In prometaphase, they colocalize on the kinetochores and MT tips (early prometaphase) (e to h, arrows) and on the cortical sites (late prometaphase) (i to l, arrows). HeLa cells were transiently transfected with LIS1-DsRed (m) and fixed under conditions preserving the MT tips (see Materials and Methods). They were labeled with polyclonal anti-CLIP-170 antibody TA (n). Panel o is a superimposition of LIS1-DsRed (green) and CLIP-170 (red). All images are maximal-intensity projections of  $x/y$  optical section stacks, acquired by three-dimensional deconvolution microscopy. Bars, 5  $\mu$ m.

bled during mitosis at the centromeres (34). They contain several large protein complexes that mediate interactions with spindle MTs and are important for fail-safe progression of mitosis (reviewed in references 41, 56, 66, and 68). In vertebrate somatic cells entering mitosis, the first kinetochore

movements are mediated by the rapid sliding of one of the sister kinetochores along the matrix of a polar MT that it has captured tangentially (43, 55). This transport is likely to be driven by the dynein/dynactin motor complex (reviewed in reference 2). Kinetochore-localized CLIP-170 (18) could play



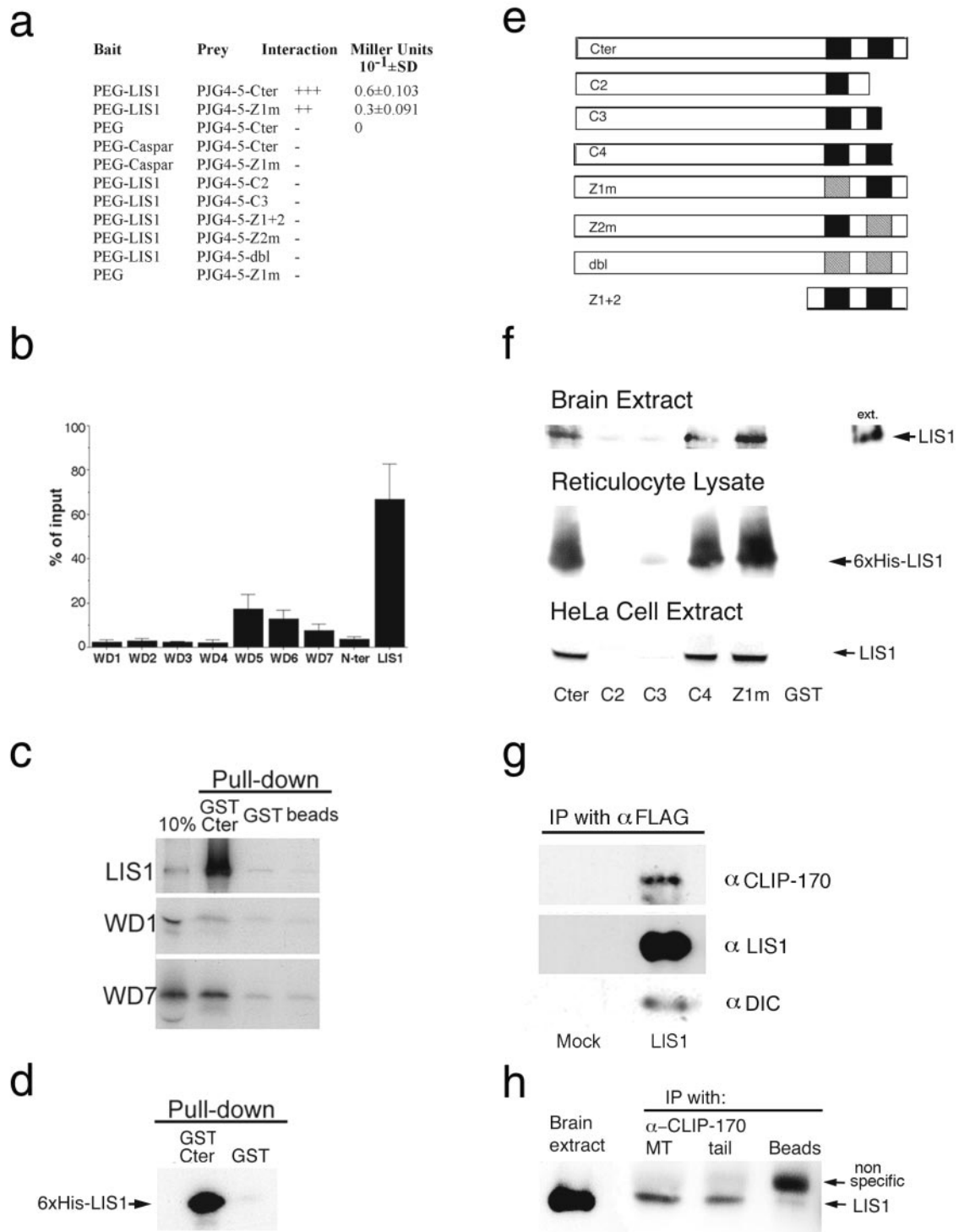


FIG. 2. Physical interaction between LIS1 and CLIP-170. (a) LIS1 interacts with the C-terminal region of CLIP-170 in a yeast two-hybrid system. Positive interactions were demonstrated between PEG-LIS1 and pJG4-5-Cter or Z1m. Other controls with empty baits or an unrelated bait (Caspar) resulted in no blue colonies. (b) CLIP-170 interaction with LIS1 requires the presence of the WD5 domain. GST pull-down assays using GST-Cter or GST (negative control) with individual domains of LIS1 that were *in vitro* translated in a reticulocyte lysate using [<sup>35</sup>S]methionine were performed. The percentage of input protein that was pulled down specifically by GST-Cter is indicated. The results presented are averages from four independent experiments  $\pm$  standard errors of the means. (c) Representative autoradiogram used for quantification of the different LIS1 domains in panel b. (d) Recombinant six-histidine LIS1 and GST-Cter-CLIP-170 interact in a GST pull-down assay. The negative control GST does not interact with LIS1. (e) Schematic presentation of the different C-terminal CLIP-170 constructs used in this study. (f) LIS1 interacts with the C-terminal domain of CLIP-170 and requires the second zinc finger domain (results of GST pull-down assays with brain extract, reticulocyte lysate, and HeLa cell extract) are shown. (g) LIS1, CLIP-170, and dynein intermediate chain coimmunoprecipitate (IP) from cells transfected with DsRed-LIS1-FLAG using anti-FLAG antibodies. (h) LIS1 and CLIP-170 coimmunoprecipitate from E15.5 mouse brain extract with two different anti-CLIP-170 antibodies. The antibodies used were the MT domain antibodies anti-CLIP-115/170 antibody no. 2221 (32) and CLIP-170 C terminus (or tail)-specific antibodies (no. 2360), as described in Materials and Methods.

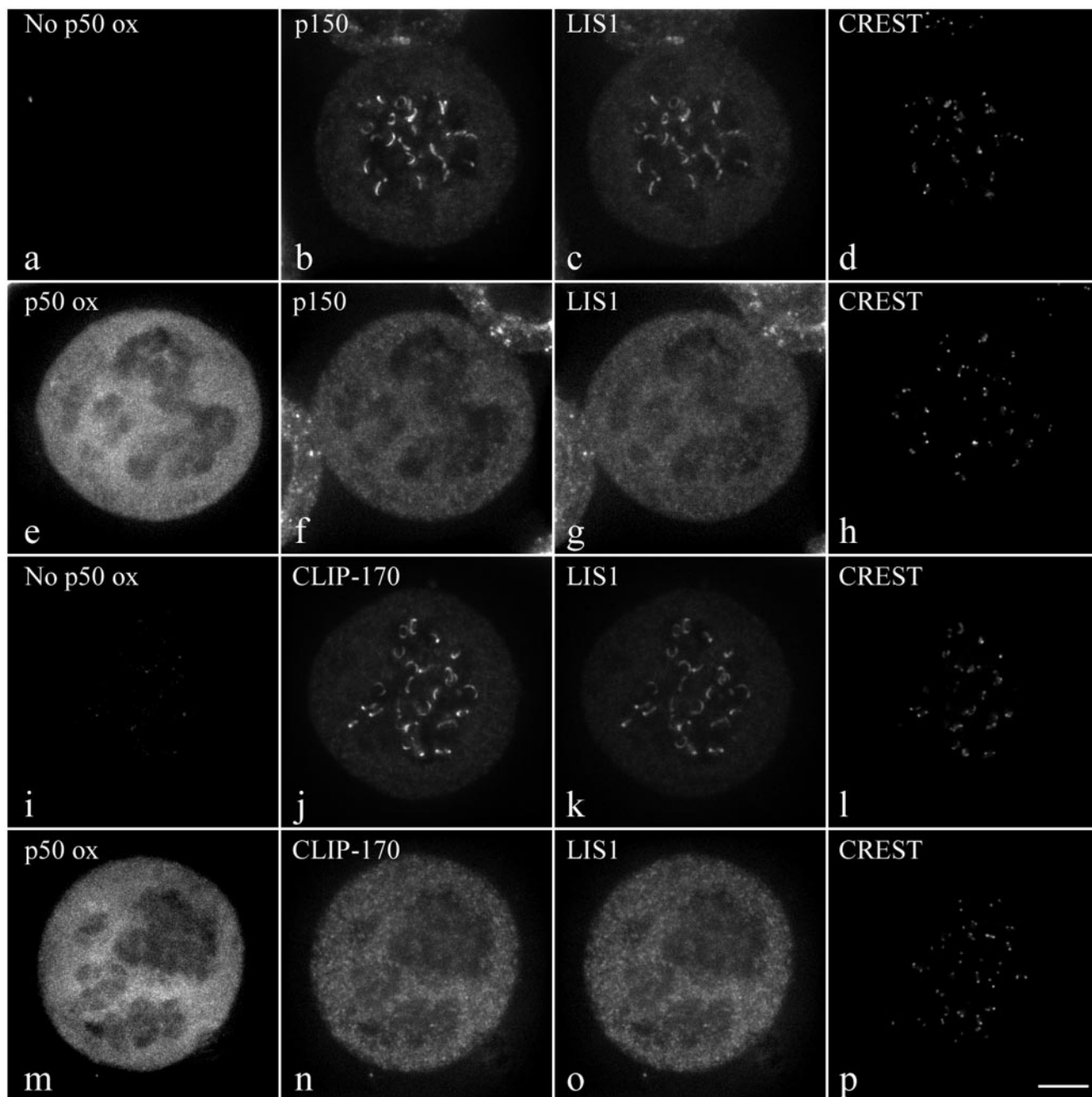


FIG. 3. Effect of p50 overexpression on CLIP-170 and LIS1 targeting to kinetochores. Triple immunostaining of mitotic control (a to d and i to l) or EGFP-p50-overexpressing (e to h and m to p) HeLa cells for either p150 (b and f), LIS1 (c and g), and CREST (d and h) or CLIP-170 (j and n), LIS1 (k and o), and CREST (l and p). Cells were treated with 10  $\mu$ M nocodazole for 4 h prior to fixation. As expected, p150 (b and f) and CLIP-170 (j and n) staining from kinetochores decreased under EGFP-p50 expression. Under these conditions LIS1 staining is also dramatically diminished (c, g, k, and o). The images in panels a and i demonstrate that there is no p50 overexpression (ox) while those in panels e and m show eGFP-p50 overexpression. All images are maximal-intensity projections of 10 consecutive planes acquired by three-dimensional deconvolution microscopy. Bar, 5  $\mu$ m.

a role in the MT-capturing process and subsequently aid the motor complex with initiating the transport, but so far, proof for this function is sparse. CLIP-170 colocalizes with the dynein/dynactin complex at nonattached kinetochores in a dynein/dynactin-dependent way (18). Like at MTs (74), this colocalization depends on the carboxy-terminal domain of CLIP-170 (18), indicating a direct or indirect association with the

motor complex. Recently, Bik1p was shown to be a +TIP and a component of the kinetochore-MT binding interface in budding yeast. Its binding to the kinetochore is dependent on the C-terminal 40 amino acids (38).

**LIS1 and dynein/dynactin.** *LIS1* is one of the genes that have a principal role in brain development, since hemizygote mutations in *LIS1* result in a severe brain malformation known

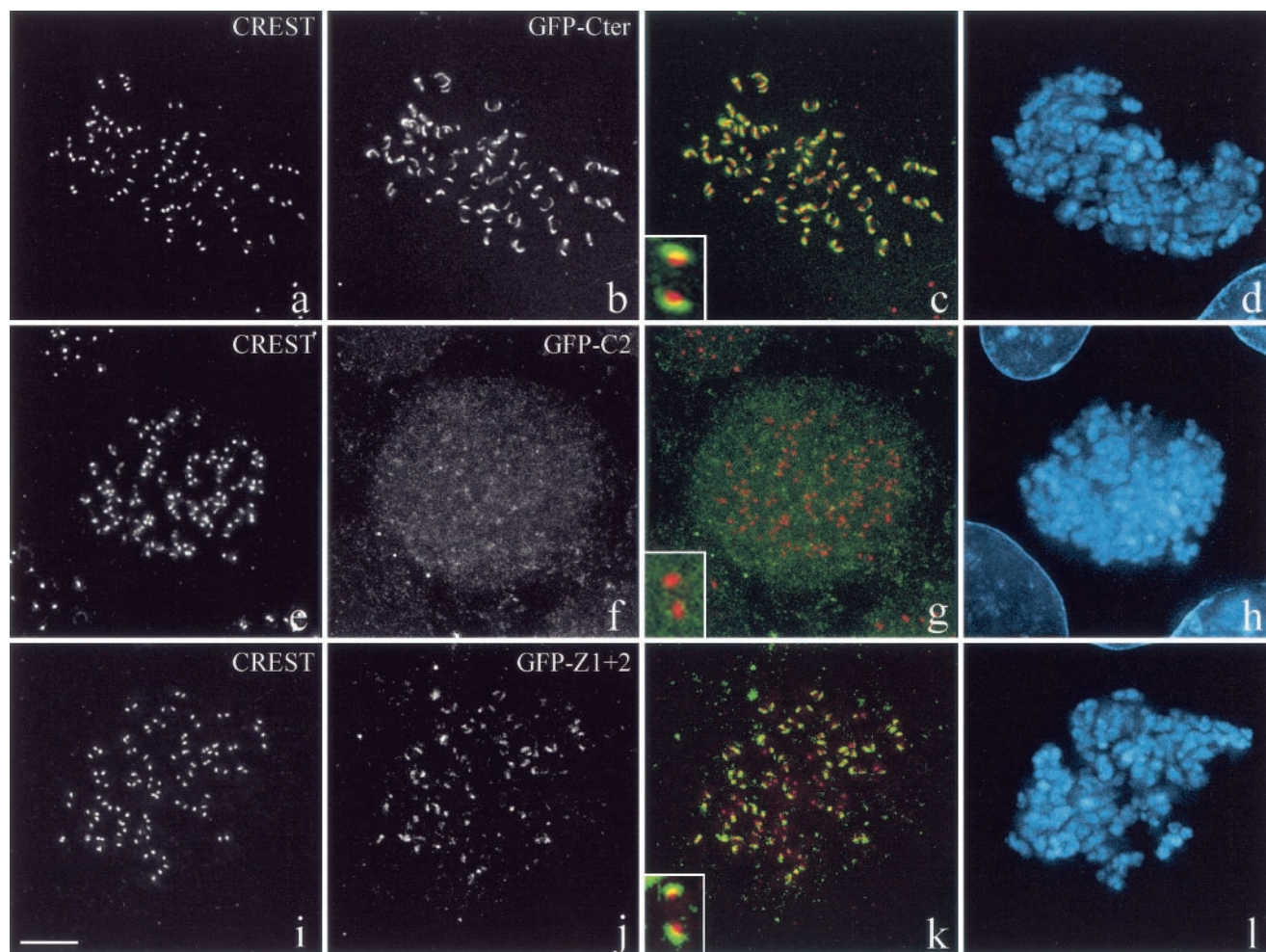


FIG. 4. CLIP-170 localization at the kinetochore is dependent on its LIS1-binding site. COS-7 cells were transiently transfected with GFP-Cter, GFP-C2, or GFP-Z1 + 2 and blocked in prometaphase by nocodazole treatment. The fixation was preceded by extraction in Triton X-100 in order to render kinetochore-bound CLIP-170 detectable. The cells were double labeled with CREST autoimmune serum (a, e, and i) and anti-GFP (b, f, and j). Panels c, g, and k are superimpositions of CREST (red) and GFP (green) signals. Chromosomes were stained with DAPI (d, h, and l). The insets in panels c, g, and k show the relative locations of GFP chimera proteins (in green) and the CREST antigens (in red). All images are maximal-intensity projections of  $xy$  optical section stacks acquired by three-dimensional deconvolution microscopy. Bar, 5  $\mu$ m.

as lissencephaly (smooth brain) (53). LIS1 contains an N-terminal region with a coiled-coil domain important for dimerization (11) and seven WD repeats that mediate protein interactions (52, 53). Recent data have provided compelling evidence for LIS1 function in the dynein/dynactin pathway. *nudF*, a *LIS1* homolog in the fungus *Aspergillus nidulans*, was identified in a screen for mutants defective in nuclear migration (46, 82). Genetic and biochemical evidence suggested that *nudF* regulates dynein motor activity and MT dynamics (3, 29, 31, 79–81). These findings are consistent with interaction of mammalian LIS1 with tubulin (58) and are corroborated by its interaction with the first P-loop of dynein heavy chain (60). Dynein, dynactin, and LIS1 also coimmunoprecipitate in cultured cells and in the brain (23, 70). In interphase mammalian cells, LIS1 was localized in a dot-like pattern along MTs but not at MT tips (58, 70), whereas in mitotic cells, it colocalizes at astral MTs, kinetochores, and cortical sites (23). Overexpression of LIS1 results in spindle misorientation and disturbance in mitotic progression (23). LIS1 could therefore be

involved in dynein/dynactin-mediated tethering of MTs to cortical sites in a yet-unknown way. Overexpression or reduced expression of LIS1 results in the disturbance of additional dynein-related functions in mammalian cells (60, 70) and in *Drosophila melanogaster* neurons (39). An additional link of LIS1 to the dynein pathway was demonstrated in yeast. A genetic screen for genes required for viability in budding yeast cells with a kinesin-like motor deleted identified many of the established dynein pathway genes (25). Pac1p and Bik1p, homologs of, respectively, LIS1 and CLIP-170 (4, 51), were identified in that screen as well. Pac1p was also found to be involved in nuclear migration together with other genes in the dynein/dynactin pathway (24, 25).

Taking into consideration the amazing conservation of LIS1 functions from *A. nidulans* to human, and based on the data from *S. cerevisiae*, indicating a possible functional relationship between *PAC1* and *BIK1*, we set out to investigate whether LIS1 and CLIP-170 interact in mammalian cells and the role of the CLIP-170 zinc finger motifs in this interaction. Here we



show, in addition to the expected localizations at kinetochores and tips of astral MTs, new colocalizations of CLIP-170 and LIS1 at MT tips in interphase cells, nuclei of prophase cells, and cortical sites contacting astral MTs in mitotic cells. We also provide evidence for the existence of a physical interaction between CLIP-170 and LIS1, involving both zinc fingers of CLIP-170 and some of the WD domains of LIS1. We report that the recruitment of LIS1 to kinetochores is dynein/dynactin dependent and that CLIP-170 targeting to these structures is via its LIS1-interacting domain. Although LIS1 has an intrinsic MT binding capacity, we show that association of a phospho-LIS1 isoform (and dynactin) to MT bundles, induced by CLIP-170 overexpression, is dependent on the distal zinc finger of CLIP-170, raising the possibility that CLIP-170 and LIS1 regulate dynein/dynactin binding to MTs. This work suggests that LIS1 is a regulated adapter between CLIP-170 and cytoplasmic dynein at sites involved in cargo MT loading, and/or in the control of MT dynamics.

#### MATERIALS AND METHODS

**Cell culture.** Culturing and transfection of COS-1 cells (32) or HeLa and COS-7 cells (18) was performed as described previously.

**Immunological methods.** Antibodies against CLIP-170 were monoclonal antibody 4D3 (54), polyclonal antibody H2A (18), and MT domain antibodies anti-CLIP-115/170 antibody no. 2221 (32). Polyclonal anti-CLIP-170 TA antibodies were produced in rabbit by using a His-tagged fusion protein comprising the last 156 C-terminal amino acids of CLIP-170 (a gift of T. Kreis). CLIP-170 C terminus-specific antibodies (no. 2360) were generated by injecting glutathione *S*-transferase (GST)–CLIP-170 C terminus (amino acids 1029 to 1320) into rabbits as described previously (32). Antibodies against LIS1 (polyclonal [no. 19, affinity purified] and monoclonal [no. 210]) were described previously (57, 58). Other antibodies were monoclonal anti-p150GLUED (Transduction Laboratories, Lexington, Ky.), anti-cytoplasmic dynein intermediate-chain monoclonal antibody 70.1 (Sigma), human CREST autoimmune antiserum recognizing the centromeric region of chromosomes (a gift from H. Ponstingl, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany), monoclonal anti- $\beta$ -tubulin (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, Calif.), and monoclonal anti-myc 9E10 (22). All secondary antibodies used for the immunofluorescence studies were made in goat and conjugated to 6-((7-amino-4-methylcoumarin-3-acetyl)amino) hexonic acid, fluorescein isothiocyanate, Cy3, or Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pa.) or ALEXA-488, -594, -350 (Molecular Probes).

For immunofluorescence of MT tips, cells were fixed in 100% methanol–1 mM EGTA for 10 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ , followed by 15 min of fixation in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were washed for 5 min in 0.15% Triton X-100–PBS, blocked in PBS–1% bovine serum albumin (BSA)–0.1% Tween, and labeled with different antibodies for 1 h at room temperature. After washing in 0.05% Tween 20–PBS sections were incubated with secondary antibodies. Slides were mounted using Vectashield mounting medium (Vector laboratories) with DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) (Sigma) and analyzed on a Leica DMRBE fluorescence microscope equipped with a Hamamatsu C4880 charge-coupled device camera.

For the colocalization experiment, HeLa cells were lysed for 2 min in 0.5% Triton X-100 and fixed in 3% paraformaldehyde in PHEM buffer (18). They were washed three times for 5 min each in PBS and further permeabilized for 25 min in 0.1% Triton X-100 in PBS. The cells were treated with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS for 10 min, washed three times for 5 min each in PBS, blocked in PBS-BSA (PBS containing 0.1% BSA), and labeled with a polyclonal anti-LIS1 antibody and the monoclonal 4D3 antibodies for 1 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . After being washed in

PBS-BSA, the cells were incubated with secondary antibodies for 45 min. The cells were postfixed in 4% formaldehyde in PBS for 16 min and treated with 50 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in PBS for 10 min. The chromosomes were stained with DAPI (Sigma) for 5 min. Coverslips were mounted using PBS–15% glycerol containing the antifading agent 1,4-diazabicyclo-(2.2.2) octane (DABCO) (Sigma) at 100 mg/ml (36). All antibodies were diluted in PBS-BSA.

For the kinetochore-targeting experiment, transfected COS-7 cells were treated with 33  $\mu\text{M}$  nocodazole for 1 h just before the fixation step. The cells were lysed for 30 s in 0.5% Triton X-100 in PHEM to remove excess soluble expressed protein, fixed for 20 min in 3% paraformaldehyde in PHEM at room temperature, washed three times for 5 min each in PBS, and further permeabilized for 25 min in 0.5% Triton X-100 in PBS. The immunofluorescences were processed as described above using CREST human serum and a polyclonal anti-GFP antibody.

For enhanced green fluorescent protein (EGFP)-p50 overexpression experiments, transfected HeLa cells were treated with 10  $\mu\text{M}$  nocodazole for 4 h before lysis and fixation, as described above. Cells were immunolabeled as previously described, using either anti-p150, polyclonal anti-LIS1 and CREST serum, or anti-p150, TA, and CREST.

For recruitment on MTs, transfected COS-7 cells were lysed for 30 s in 0.5% Triton X-100 in PHEM to remove excess soluble expressed protein and fixed for 20 min in 3% paraformaldehyde. The immunofluorescences were processed as described above using a polyclonal or monoclonal anti-c-myc antibody with a polyclonal anti-LIS1 antibody, the 210 monoclonal antibody, or the monoclonal anti-p150 antibody. For COS-7 cells transfected with CLIP- $\Delta\text{RAC}$ -DsRed, the immunofluorescence was processed with a monoclonal anti-EB1 antibody or the TA antibody.

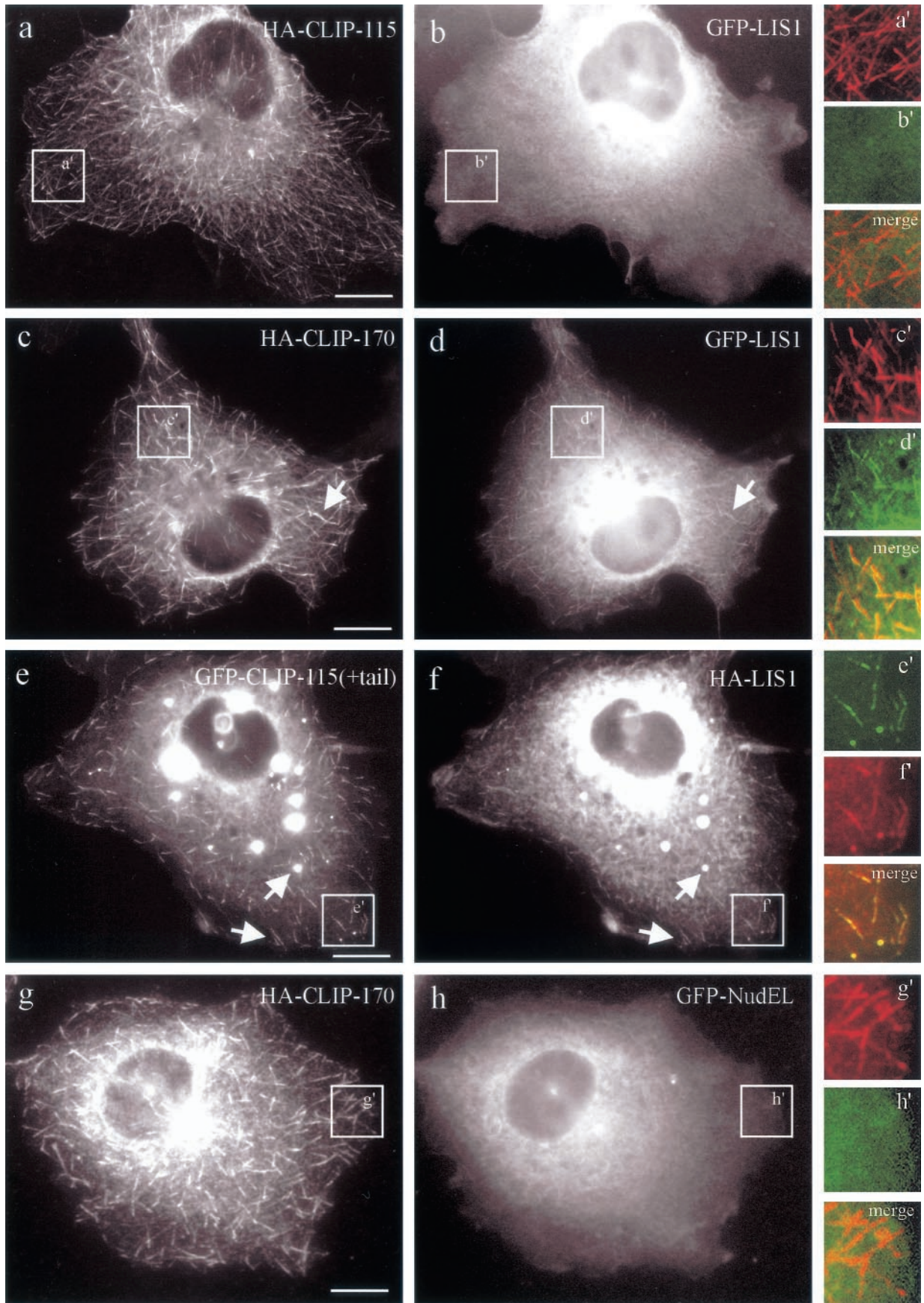
**Wide-field optical sectioning fluorescence microscopy.** Pictures of fixed cells were collected using a three-dimensional deconvolution imaging system, the detailed description and validation of which will be published elsewhere (J.-B. Sibarita and J. R. De Mey, unpublished data). A brief description has been published previously (61).

**Protein methods.** GST pull-down experiments with brain extracts and reticulocyte lysates were done as described previously (59). HeLa cells were extracted as described previously (15). For GST pull-down experiments, 100  $\mu\text{g}$  of HeLa cells proteins and 10  $\mu\text{g}$  of recombinant proteins on glutathione beads were used in a final volume of 500  $\mu\text{l}$ . Beads were processed as described previously (59). Immunoprecipitations were done as described previously (13). Yeast two-hybrid assays were done according to the instructions of the manufacturer (Origene, Rockville, Md.).

**Expression constructs.** The mammalian expression vectors pEGFP-C (Clontech, Palo Alto, Calif.) were used to construct GFP-CLIP-115 and GFP-CLIP-170-br (32). These vectors were also used to construct GFP-CLIP-170(–tail), in which the last 79 amino acids of CLIP-170-br are deleted, and GFP-CLIP-115(+tail), which contains the C-terminal 159 amino acids of CLIP-170 linked in frame to CLIP-115 in front of its stop codon. GFP-LIS1 (mouse LIS1 cDNA was obtained by reverse transcription-PCR from total mouse brain RNA), GFP-NudC (mouse NudC cDNA is IMAGE clone 2646247 [accession number AW322862]), GFP-NudE (human NudE cDNA is IMAGE clone 2820974 [accession number AW249237]), and GFP-NudEL (mouse NudEL cDNA is IMAGE clone 2646029 [accession number AW322683]) were cloned by PCR into pEGFP vector. To generate HA-CLIP-115 and HA-CLIP-170-br fusions, the pMT2SM-HA vector was used; HA-LIS1 was produced by substituting GFP for the hemagglutinin (HA) tag in the corresponding fusion construct.

The plasmids encoding wild-type CLIP-170 and CLIP-170  $\Delta 55$ –346 (lacking the MT-binding regions) are referred to here as wt-CLIP-170 and  $\Delta\text{N}$ -CLIP-170, respectively, and have been described elsewhere (50, 51). These fusion proteins have been tagged with a c-myc epitope at the N terminus. These cDNA constructs were a gift of T. Kreis and P. Pierre (University of Geneva, Geneva, Switzerland). The myc-tagged wt-CLIP-170 cDNA was inserted into the *EcoRI* site of the pSG5 vector. The expression of the fusion protein is under control of the simian virus 40 promoter. The C-terminal *XhoI/BamHI* fragment of CLIP-170 (corresponding to the last 156 amino acids) was inserted in the pBluescript

FIG. 5. CLIP-170, but not CLIP-115, recruits epitope-tagged LIS1 to MT distal ends. COS-1 cells were cotransfected with HA-CLIP-115 and GFP-LIS1 (a and b), HA-CLIP-170 and GFP-LIS1 (c and d), GFP-CLIP-115(+tail) and HA-LIS1 (e and f), and HA-CLIP-170 and GFP-NudEL (g and h). In the GFP-CLIP-115(+tail) construct, the zinc “knuckle”-containing domain of CLIP-170 was transferred to CLIP-115. LIS1, recruited to CLIP-positive structures, is indicated by arrows. Panels a' to h' represent colored enlargements of the areas indicated in panels a to h. The merged images of panels a' to h' demonstrate overlap (or the lack of it) at MT distal ends of the different tagged proteins. Bar, 10  $\mu\text{m}$ .





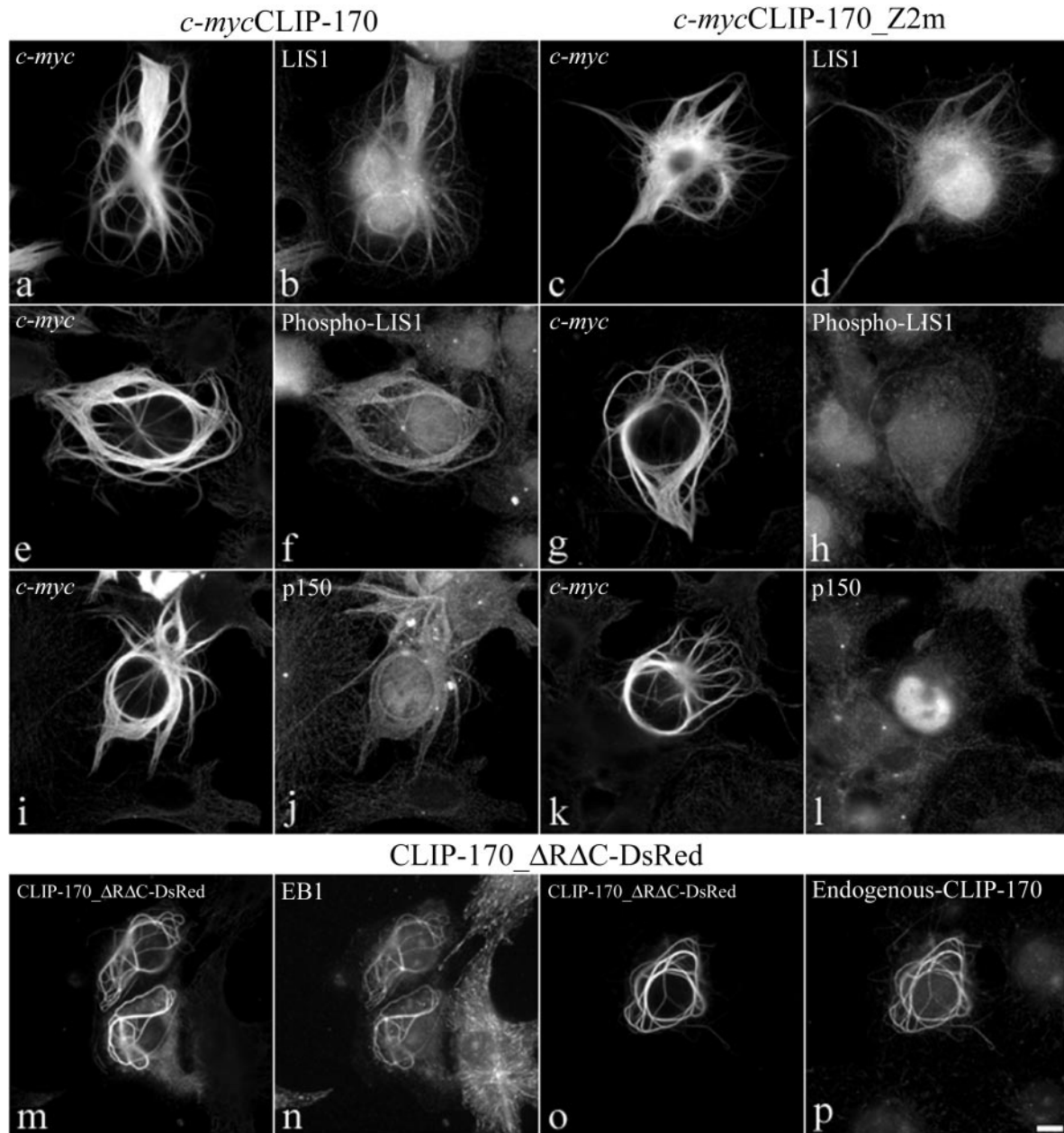


FIG. 6. Binding of a specific phospho-LIS1 isoform to CLIP-170-induced MT bundles is dependent on the second zinc finger domain of CLIP-170. COS-7 cells were transiently transfected with *c-myc*CLIP-170 (a, b, e, f, i, and j), with *c-myc*CLIP-170-Z2m (c, d, g, h, k, and l), or with CLIP- $\Delta$ RAC-DsRed (m, n, o, and p). The fixation was preceded by a brief extraction in Triton X-100. (a to d) The cells were double labeled with a polyclonal anti-*c-myc* antibody (a and c) and a polyclonal anti-LIS1 (b and d). (e to l) The cells are double labeled with the monoclonal anti-*c-myc* 9E10 antibody (e, g, i, and k) and the monoclonal anti-phospho-LIS1 210 antibody (f and h) or a monoclonal anti-p150 antibody (j and l). (m to o) The cells were labeled with a monoclonal anti-EB1 antibody (n) or the polyclonal antibody TA against the C-terminal portion of CLIP-170 (p). All of the CLIP-170 constructs give rise to the formation of thick MT bundles. LIS1 is always recruited to the bundles (b and d). A mutation in the second zinc finger domain (Z2m) diminishes the recruitment of a phospho-LIS1 isoform and p150 to the bundles (f and j versus h and l). Bar, 10  $\mu$ m.

II KS(-), pEGFPC3, pEG202 (with a modified multiple cloning site [MCS]), and pJG4-5 (with a modified MCS) vectors in phase with the GFP (Clontech) and LEXA and AD (Origene) genes, respectively. These constructs were named, respectively, pBS-Cter, pEGFP-Cter, pEG202-Cter, and pJG4-5-Cter. pBS-Cter was digested with *Xho*I and *Not*I enzymes, and the resulting *Xho*I/*Not*I fragment was inserted in pGEX4T3 at the *Sal*I and *Not*I sites to give pGEX-Cter. A C-terminal fragment corresponding to the last 64 amino acids of the CLIP-170 was generated by PCR using  $\Delta$ N-CLIP170 as a template and the primers 5'T

CAAGCTCGAGCCTCGCCTCTTCTGTGACATT-3' and 5'AGATCTGGATCCGAATCCCTAGTCTGTATGT3'. This fragment was inserted in the pEGFPC3, pEG202 (with a modified MCS), and pJG4-5 (with a modified MCS) vectors to give pEGFP-Z1 + 2, pEG202-Z1 + 2, and pJG4-5-Z1 + 2.

Fusion proteins lacking the C-terminal 20 amino acids of CLIP-170 were generated as follows.  $\Delta$ N-CLIP170 was used as a template to amplify by PCR the cDNA sequence of CLIP-170 and introduce a stop codon and a *Bam*HI restriction site by using the primers 5'-CTGAGAAATGAGGTCACAGT-3' and 5'T

ATTAGATCCTTAGTATGGGCGTTCCTCACC-3'. The PCR product was digested with *XhoI* and *BamHI* enzymes and was exchanged with the *XhoI/BamHI* fragment of pSG5-wt-CLIP-170, pSG5- $\Delta$ N-CLIP-170, pEGFPC3, pEG202 (modified MCS), pJG4-5 (modified MCS), and pBluescript II KS(-). These constructs were named, respectively,  $\Delta$ C2,  $\Delta$ N $\Delta$ C2, pEGFP- $\Delta$ C2, pEG202- $\Delta$ C2, pJG4-5- $\Delta$ C2, and pBS- $\Delta$ C2. The pBluescript vector containing the *XhoI/BamHI* PCR product was digested with *XhoI* and *NotI*, and the resulting *XhoI/NotI* fragment was inserted in pGEX4T3 at the *SalI* and *NotI* sites to give pGEX- $\Delta$ C2.

Fusion proteins lacking the C-terminal 14 and 6 amino acids were generated as described above using the primers 5'TATTAGGATCCTTACATCTCACAG ATTTTCACAGTATGG-3' and 5'TATTAGGATCCTTAGCAGTTGGTGGCC CAGTGTCC-3' to introduce the modifications. They were named, respectively,  $\Delta$ C3,  $\Delta$ N $\Delta$ C3, pEGFP- $\Delta$ C3, pEG202- $\Delta$ C3, pJG4-5- $\Delta$ C3, pBS- $\Delta$ C3, pGEX- $\Delta$ C3,  $\Delta$ C4,  $\Delta$ N $\Delta$ C4, pEGFP- $\Delta$ C4, pBS- $\Delta$ C4, and pGEX- $\Delta$ C4.

Fusion proteins with mutations C1333M and C1336M (mutations in the first zinc finger motif) were generated using the Quick Change Kit (Stratagene, La Jolla, Calif.). The C-terminal *XhoI/BamHI* fragment of CLIP-170 cDNA subcloned in pBluescript KS(-) was used as a template with the primers 5'TGGA GATCAAAGCAGTCCATAATGTCCATGAAGAGGCGAGGTTTCTT-3' and 5'AAGAAACCTCGCCTCTTCATGGACATTATGGACTGCTTTGATCTCC A-3'. The mutated *XhoI/BamHI* fragment was exchanged with that of pSG5-wt-CLIP-170 and was inserted in pEGFPC3, pEG202 (modified MCS), and pJG4-5 (modified MCS) to give Z1m, pEGFPC3-Z1m, pEG202-Z1m, and pJG4-5-Z1m, respectively. The pBluescript vector containing the *XhoI/BamHI* mutated fragment was digested with *XhoI* and *NotI*, and the resulting *XhoI/NotI* fragment was inserted in pGEX4T3 at the *SalI* and *NotI* sites. The resulting construct was named pGEX-Z1m.

Fusion proteins with mutations C1373M and C1376M (mutations in the second zinc finger motif) were generated as described above using the primers 5'GGTGA GGAACGCCATACATGGAAATCATGGAGATGTTGGACAC-3' and 5'-G TGTCAAACATCTCCATGATTTCATGTATGGGCGTTCCTCACC-3'. The resulting constructs were named, respectively, Z2m, pEGFPC3-Z2m, pEG202-Z2m, pJG4-5-Z2m, and pGEX-Z2m.

Fusion proteins with mutations C1333M, C1336M, C1373M, and C1376 M (mutations in the two zinc finger motifs) were generated as described above using the mutated C1333M and C1336M C-terminal *XhoI/BamHI* fragment of CLIP-170 cDNA subcloned in pBluescript II KS(-) as a template with the primers 5'GGTGA AGGAACGCCATACATGGAAATCATGGAGATGTTGGACAC-3' and 5'-GTGTCCAAACATCTCCATGATTTCATGTATGGGCGTTCCTCACC-3'. The resulting constructs were named, respectively, dblZm, pEGFPC3-dblZm, pEG202-dblZm, pJG4-5-dblZm, and pGEX-dblZm.

A fusion protein corresponding to the first 361 amino acids of c-mycCLIP-170 was generated as follows. The DsRed gene was subcloned in the pVNC7 vector (modified from pVM116 [35]) at the *BamHI* and *NotI* sites to give pVNC7-DsRed. The *EcoRI/BglII* fragment of CLIP-170 was inserted into the *EcoRI* and *BglII* sites of pVNC7-DsRed. This construct was digested with *BglII* and *AgeI* enzymes and treated with Klenow polymerase. The final construct was named CLIP- $\Delta$ R $\Delta$ C-DsRed.

All PCR-amplified sequences and all translation phases of the fusion proteins have been verified by sequencing.

The expression vector pDsRed-FLAG-LIS1 was generated by site-directed mutagenesis of the stop codon, introducing an *NcoI* site, this was cloned in frame with a FLAG epitope and then into pDsRed (Clontech). Point mutations were generated using the Quick Change protocol (Stratagene). The LIS1 yeast two-hybrid construct was described previously (67).

## RESULTS

**Colocalization of LIS1 and CLIP-170 at MT-dependent and -independent sites.** Published data indicate that LIS1 and CLIP-170 may each colocalize at sites also known to accumulate the dynein/dynactin complex (10, 18, 23, 77). In order to assess this, we used mainly HeLa cells, but comparable results were obtained in COS-7 and MDCK cells (not shown). During mitosis, colocalization of LIS1 and CLIP-170 was seen at the nuclear envelopes of prophase cells (Fig. 1a to d). In early prometaphase cells, colocalization was observed at unattached kinetochores (Fig. 1e to h). The position of the kinetochores is marked by the autoimmune CREST serum (Fig. 1h and l). The

proteins localize to kinetochores in dots that are adjacent to CREST but do not completely overlap, since anti-CREST autoimmune serum labels the centromeres (19, 20, 41) while CLIP-170 and dynein localize to the fibrous corona (18; reviewed in reference 41). In early prometaphase cells, LIS1 and CLIP-170 also colocalize at the tips of astral MTs (Fig. 1e to h) but also at the cell cortex, where sites accumulating LIS1 and CLIP-170 can be seen (Fig. 1i to l). At all of these sites, dynactin and dynein were detected (not shown). We described earlier such cortical sites accumulating dynein and dynactin in polarized MDCK cells (10). In view of their restricted topology (the belt of adherens junctions, just beneath the tight junctions) and the fact that they interact with astral MTs, we have proposed that these cortical sites play a role in spindle positioning and movements. This is the first demonstration of colocalization of LIS1 and CLIP-170 in these structures. LIS1 was shown to interact with MTs before (58, 70), but it was never seen at MT tips in interphase cells. Since some of the results described below pointed to the possibility of LIS1 binding to MT tips in a CLIP-170-dependent way, we expressed a LIS1-FLAG-DsRed-tagged form and studied its colocalization with CLIP-170. We first ascertained that this form was distributed in a manner similar to all of the known localizations of LIS1, and we also observed that under the conditions used here, it did not cause aberrant mitosis (data not shown), as described by others (23). In interphase cells, LIS1-FLAG-DsRed colocalized with endogenous CLIP-170 at MT plus ends, even in cells expressing very moderate levels (Fig. 1m to o). LIS1 was also distributed as a series of linearly arranged spots, in agreement with the usual immunostaining along MTs (58). We conclude that in mammalian cells too, LIS1 is associated with growing MT plus ends. This localization pattern resembles the dynein labeling at MT tips (77) and is consistent with LIS1 being attached to dynein (23, 60, 70). These results are also consistent with the possibility that LIS1 is being attached to any of a variety of other proteins such as dynactin or EB1; however, at present we do not have evidence supporting these possibilities. The colocalization of CLIP-170 and LIS1 prompted us to investigate further the potential physical interactions between LIS1 and CLIP-170.

**Physical interactions and mapping of interaction domains.** Several assays allowed us to demonstrate an interaction between LIS1 and CLIP-170 and also to map the domains of interaction in both proteins. The yeast two-hybrid system (28) revealed LIS1 interaction with the C-terminal domain of CLIP-170 (Cter in Fig. 2e). A point mutation in the first zinc domain (Z1m in Fig. 2e) weakened the interaction as measured by a liquid  $\beta$ -galactosidase assay (Fig. 2a). A pull-down experiment using the purified recombinant proteins GST-Cter and 6-His-LIS1 demonstrated a direct interaction without the presence of other cellular proteins (Fig. 2d). Several deletions and mutations (C2, C3, and Z2m in Fig. 2e) abolished the interaction. Mapping of the precise interacting domain in CLIP-170 was done using GST pull-down assays with in vitro-translated LIS1 in a reticulocyte lysate extract or endogenous LIS1 from brain or HeLa cell extract (Fig. 2f). The distal zinc finger domain of CLIP-170 was shown to be necessary for LIS1 binding. Deletion of part or all of this domain (C2 and C3) (Fig. 2f) and point mutations in the second or both zinc finger motifs abolished the interaction. However, deleting the last six

amino acids that are not part of the zinc finger (C4) (Fig. 2f) did not affect LIS1 binding. Consistent with the results obtained in the yeast two-hybrid experiments, point mutations in the first zinc finger (Z1m) did not disrupt the interaction. Mapping of the interaction domain in LIS1 indicated that the full-length protein is most efficient in binding CLIP-170; nevertheless, WD5, -6, and -7, in reducing order of importance, play a role in the interaction (Fig. 2b and c). In vivo experiments also support an interaction between LIS1 and CLIP-170, as these proteins can be coimmunoprecipitated from LIS1-FLAG-DsRed-transfected cells (Fig. 2g) and from mouse embryonic brain extract (Fig. 2h). We could coprecipitate the dynein intermediate chain by using anti-FLAG antibodies from LIS1-FLAG-DsRed-transfected cells (Fig. 2g). However, dynein intermediate chain was not immunoprecipitated with anti-CLIP-170 antibodies (data not shown).

**LIS1 and CLIP-170 at kinetochores.** To unravel the functional importance of the LIS1–CLIP-170 interaction we have carefully examined kinetochores, where both proteins colocalize at the fibrous corona.

**(i) LIS1 recruitment to kinetochores is dynein/dynactin dependent.** Disruption of the dynein/dynactin protein complex by overexpression of the dynactin subunit p50 causes dissociation of cytoplasmic dynein (9, 21) and CLIP-170 (18) from prometaphase kinetochores. We demonstrate here that overexpression of p50 also results in a significant reduction of LIS1 kinetochore localization (Fig. 3g versus c and o versus k), similar to the reduction in the dynactin subunit p150 (Fig. 3f versus b) and CLIP-170 (Fig. 3n versus j). We conclude that LIS1 targeting to kinetochores is dependent upon the dynein/dynactin complex.

**(ii) Recruitment of CLIP-170 at kinetochores depends on its LIS1-interacting domain.** A GFP-tagged wild-type C-terminal fragment of CLIP-170 localizes to kinetochores (Fig. 4a to d), but deletion of the second zinc finger results in a diffuse GFP signal (Fig. 4e to h). Mutations in the first zinc finger motif reduce the CLIP-170 kinetochore signal significantly (data not shown), thus mirroring our results with yeast two-hybrid assays. Nevertheless, expression of the two zinc finger domains by themselves (Z1 + 2) is sufficient to successfully target CLIP-170 to the kinetochores (Fig. 4i to l). We cannot exclude the possibility that the second zinc finger domain interacts directly with additional proteins located at the kinetochore; however, our interpretation is based on the available data. We conclude that the LIS1 binding domain is necessary and sufficient for the recruitment of CLIP-170 to kinetochores.

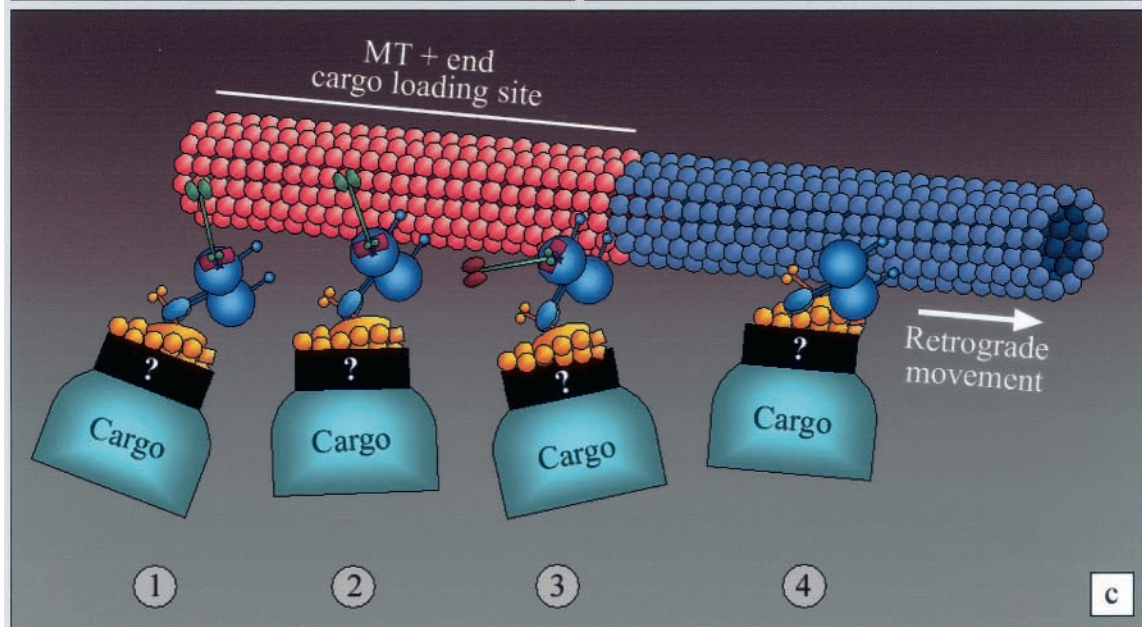
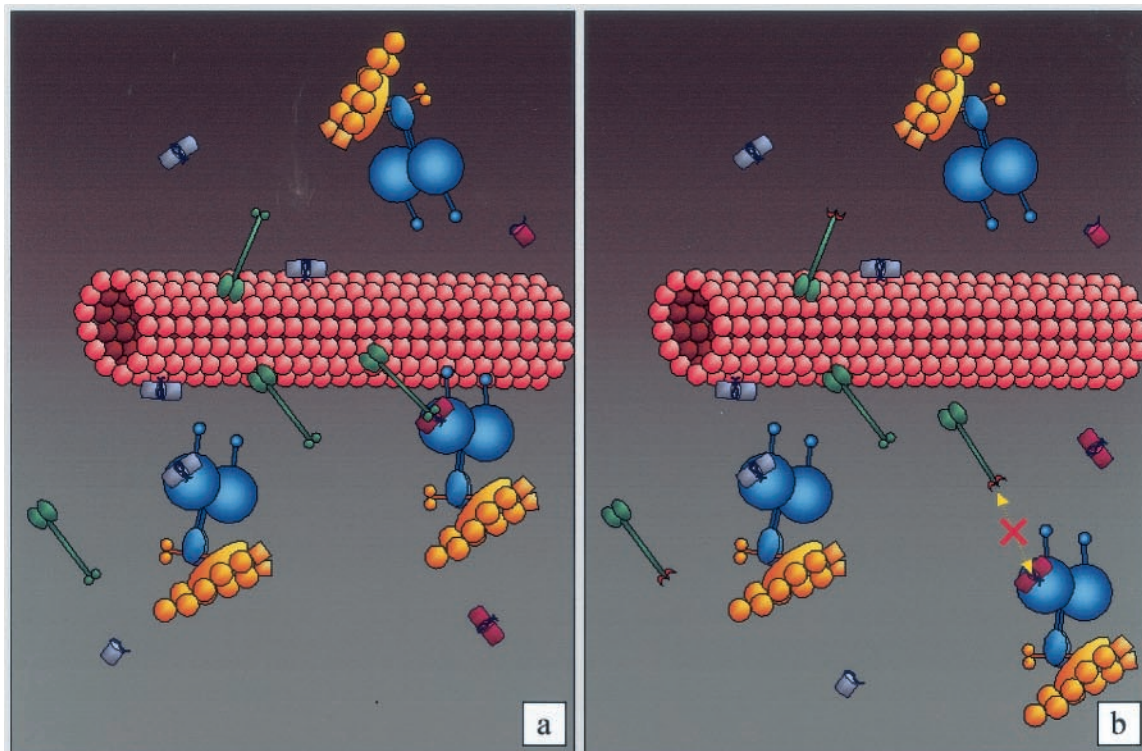
**Recruitment of LIS1 to MT ends in interphase cells over-**

**expressing CLIP-170.** Overexpression of LIS1 has been shown to abolish dynactin accumulation at the MT plus ends (23). We wanted to test if overexpression of CLIP-170 or its closest mammalian homolog, CLIP-115, can influence the MT plus-end targeting of LIS1 and other proteins (NudE, NudEL, and NudC) which are implicated in the dynein/dynactin pathway as well (47, 63, 76). Overexpression of HA-CLIP-170 induced accumulation of coexpressed GFP-tagged LIS1 at the tips of MTs (Fig. 5c and d). This was not the case when HA-CLIP-115 was instead expressed at medium overexpression levels (Fig. 5a and b), suggesting that its MT binding and coiled-coil domains are not interacting with LIS1. Based on these observations, a chimeric protein consisting of GFP-CLIP-115 and the C terminus of CLIP-170 [GFP-CLIP-115(+tail)] was tested. At low levels of expression, GFP-CLIP-115(+tail) is present at MT plus ends, and at higher levels it accumulates in patchy (data not shown) or spherical (Fig. 5e) aggregates, which also recruit HA-tagged LIS1 (Fig. 5f). This demonstrates that the last 159 amino acids of CLIP-170, which include the two zinc finger motifs, are sufficient to relocate LIS1. GFP fusion proteins of NudE, NudEL, and NudC were not recruited to MTs by any of the CLIPs (either in double transfections with HA-CLIP fusions or in triple transfections with an untagged CLIP and an HA-LIS1-expressing construct) (Fig. 5g and h and data not shown). In addition, none of the NudE/EL/C constructs had an apparent influence on the localization of dynactin to MT tips (data not shown). We conclude that the LIS1-associated proteins NudE, NudEL, and NudC are not involved in CLIP-170-mediated recruitment of LIS1 to MT plus ends.

**A phospho-LIS1 isoform binds to MT bundles in interphase cells in a CLIP-170-dependent way.** Cells transfected with CLIP-170 constructs containing the MT binding domains form dense MT bundles (50) (Fig. 6a, c, e, g, i, and k). These bundles are formed also when CLIP-170 lacks the coiled-coil dimerization domain (CLIP-170- $\Delta$ RAC) (Fig. 6m and o). LIS1 is recruited to these bundles (Fig. 6b) also when the second zinc finger motif of CLIP-170 is mutated (Fig. 6d), or when the bundles are induced by monomeric CLIP-170- $\Delta$ RAC (data not shown). However, the second zinc finger appears to be crucial in the recruitment of a phospho-LIS1 isoform that is specifically detected by the monoclonal anti-LIS1 antiserum, clone 210 (57). Mutations in the distal zinc finger motif of CLIP-170 reduced the recruitment of this phospho-LIS1 isoform to the bundles (Fig. 6f versus h). Interestingly, the dynactin subunit p150 also is not recruited to the MT bundles formed by CLIP-170-Z2m (Fig. 6l versus h) or by CLIP-170- $\Delta$ RAC (data not shown). On the other hand, both EB1 and endogenous CLIP-

FIG. 7. A model of LIS1 mediating CLIP-170 interactions with the dynein/dynactin pathway. (a) LIS1 can bind to MT bundles; however, phospho-LIS1 (recognized by the 210 antibody) binding to MT bundles is mediated through the distal zinc finger motif of CLIP-170. (b) When the distal zinc finger motif of CLIP-170 is mutated, the phospho-LIS1 isoform can no longer bind to MT bundles. This can also explain why p150/dynactin is not recruited to the MT bundles. (c) Possible kinetics of the interactions. CLIP-170 targets the dynein/dynactin complex to the MT, using phospho-LIS1 as an adapter (step 1); the motor complex, being in the proximity of the MT, associates with it (step 2); the initial static link to the MT provided by CLIP-170 is released by its hyperphosphorylation (step 3); and the retrograde dynein/dynactin-dependent movement of the cargo (endocytic vesicle, kinetochore, etc.) takes place (step 4). Tip1p, the CLIP-170 ortholog in *S. pombe*, has been reported by Brunner and Nurse (8) to act as an anticatastrophe factor. Based on the model depicted here, it also could be that CLIP-170 plays a similar role in eukaryotic cells by targeting MT-stabilizing factors as cargo to the plus tips. The model is based on that of Rickard and Kreis (54; reviewed in references 1a, 54a, and 75).





**Legend:**

- |   |  |
|---|--|
|  Microtubule                   |  Dynactin complex                   |
|  CLIP-170, hypophosphorylated  |  Dynein complex                     |
|  CLIP-170, hyperphosphorylated |  LIS1, non phosphorylated           |
|  CLIP-170, Z2m                 |  LIS1, phosphorylated (210 epitope) |

170 are recruited to the MT bundles induced by all of the MT-binding CLIP-170 forms tested (shown here is CLIP-170- $\Delta$ RAC-DsRed [Fig. 6o and p]). Taken together, these results suggest that LIS1 targeting to specific intracellular structures is regulated both by phosphorylation and by CLIP-170. These results are supported by our previous observations that another monoclonal antibody, clone 338, and clone 210 recognize distinct, but not all, phospho-epitopes of LIS1 (reference 57 and data not shown), suggesting that LIS1 exists in the cell as several pools that are differentially regulated.

## DISCUSSION

Orchestrating cellular functions requires modular and dynamic interactions between proteins. Our data indicate a direct physical interaction between LIS1 and CLIP-170 *in vitro*; *in vivo* the two proteins are found in the same complex in embryonic brain and coimmunoprecipitate. GST pull-down assays and yeast two-hybrid experiments demonstrated that the CLIP-170 second zinc finger is necessary for this interaction. Overexpressed GFP-LIS1 is recruited by epitope-tagged CLIP-170 to MT tips during interphase. The experiments indicated clearly that the MT binding domains and the coiled-coil region are not mediating the interaction between CLIP-170 and LIS1, since CLIP-115 does not relocalize LIS1 to MT tips in the absence of the CLIP-170 zinc finger motifs. Yeast two-hybrid results and kinetochore targeting indicated that point mutations in the first zinc finger domain reduce the strength of interaction, suggesting a functional role for this domain as well. The regulatory role of the first zinc finger domain most likely developed during evolution, since budding and fission yeasts contain only one zinc finger domain (4, 8, 51). Within LIS1, the WD 5, -6, and -7 domains contribute to the interaction; however, it is clear that the protein as a whole interacts with CLIP-170 much better than its subdomains. Furthermore, our results suggest that specific LIS1 phosphorylation might be an *in vivo* mode of regulating its interaction with CLIP-170. Our previous results indeed indicated that LIS1 exists in the cell as several pools that are differentially regulated on several phosphorylation sites, some of which are recognized by different monoclonal antibodies (57). Endogenous LIS1 molecules bind to MTs along their length in a CLIP-170-independent manner, and therefore, the same can be assumed to hold for the LIS1 pool recognized on these bundles by our affinity-purified polyclonal antibodies. The phospho-LIS1 isoform recognized by clone 210 (57) is strongly recruited to kinetochores (not shown), and interestingly, its recruitment to MT bundles induced by overexpressed MT-binding forms of CLIP-170 is dependent on CLIP-170's distal zinc finger. Our proposed model in Fig. 7 illustrates our assumptions.

One important cellular colocalization of LIS1 and CLIP-170 is at the kinetochores, probably the best-characterized structure tethering MTs. The dynein/dynactin motor complex is present at unattached kinetochores (75), and proteins like CLIP-170 and LIS1 are thought to contribute to its functioning, in yet-unresolved ways (18, 23). The recruitment of dynein/dynactin/LIS1/CLIP-170 to the kinetochores is not dependent upon MTs, as following nocodazole treatment these proteins still accumulate at these sites (18, 30, 72; this study). In this work we demonstrate a hierarchy of interactions at the kinetochore.

The initial targeting of LIS1 to kinetochores is dynein/dynactin dependent, since overexpression of p50 results in reduction of LIS1 at these sites. Recruitment of CLIP-170 to kinetochores appears to be LIS1 dependent, since deletions or mutations in its LIS1 binding domain abolish CLIP-170 kinetochore targeting. The CLIP-170 MT binding domains play a role in chromosome congression to the equatorial plate (18). We propose that the recruitment of CLIP-170 to kinetochores via LIS1/dynein/dynactin is an important step in this process and facilitates the initial coupling of kinetochores to MTs prior to their first poleward movement.

We show here that CLIP-170 and LIS1 also colocalize at cortical sites which capture astral MTs. This further illustrates the analogy between kinetochores and the cortical sites (34). It may be hypothesized that LIS1 is involved there in MT capturing since its over- or underexpression perturbs spindle positioning in both *D. melanogaster* oogenesis and early embryos (40) and in mammalian epithelial cells (23). The regulated physical link with CLIP-170 that we report here may be involved in the molecular mechanism for tethering MTs to positional cortical cues.

Another new finding is that in interphase mammalian cells, LIS1 colocalizes with CLIP-170 at the tips of polymerizing MTs. Dynein/dynactin, which is known to regulate MT dynamics, also associates with MT tips (77). This motor complex could function via a highly regulated linker function of LIS1 connecting it to CLIP-170, but our data and those of others (74) do not yet provide direct evidence that this is indeed the case.

Overall, LIS1 phosphorylation may affect its binding to MTs, as previously suggested (57). It is likely that several phosphorylation sites regulate LIS1 activity, its cellular localization, and its binding to other interacting proteins. The monoclonal antibody 210 has provided us with unique opportunities to investigate this question. A hierarchy of interactions was exemplified by examining the MT bundles induced by CLIP-170 mutated in the distal zinc finger domain or lacking the coiled-coil and C-terminal domains, where no specific phospho-LIS1 isoform accumulated. On these bundles we detected EB1 and endogenous CLIP-170; however, p150 was not recruited there. This result is interesting in view of the finding that EB1 can associate with p150, the intermediate chain of cytoplasmic dynein, and with dynamitin (p50) (5). None of the interactions demonstrated were necessarily direct; nevertheless, within the context of these MT bundles, our results suggest that EB1 and LIS1 interact directly with MTs. The specific phospho-LIS1 isoform, however, is recruited to the bundles only via CLIP-170, and we suggest that p150 is recruited to the bundles via this phospho-LIS1 form, probably mediated by dynein. This somewhat resembles the dynactin interaction with the kinesin-related motor HsEg5, which is regulated by phosphorylation (6). In addition, very similar to the case for LIS1 and CLIP-170, the interaction of the cytoplasmic dynein intermediate chain with dynactin is regulated by serine 84 phosphorylation (78). The dynein intermediate chain is also a WD repeat protein, similar to LIS1, and contains a phosphorylation site within its N-terminal region following a coiled-coil domain (78). It is amazing to reveal such a similar pattern of regulation of interaction by phosphorylation of residues within the same protein module. This work suggests that LIS1 is a phosphorylation-



dependent linker between CLIP-170 and cytoplasmic dynein at sites involved in positional cue-MT tethering and/or in control of MT dynamics.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The first two authors contributed equally to this work.

We thank Anne Moreau for technical assistance. Jean-Baptiste Sibarita is acknowledged for his expertise with image deconvolution.

This work was supported in part by the Fritz Thyssen Stiftung Foundation, HFSP grant no. RG283199 9, March of Dimes grant no. 6-FY01-5, and the Minerva Foundation (to O.R.) and by the Association pour la Recherche contre le Cancer (Villejuif, France) (to J.R.D.M.). O.R. is an Incumbent of the Aser Rothstein Career Development Chair in Genetic Diseases.

#### REFERENCES

- Akhmanova, A., C. C. Hoogenraad, K. Drabek, T. Stepanova, B. Dortland, T. Verkerk, W. Vermeulen, B. M. Burgering, C. I. De Zeeuw, F. Grosveld, and N. Galjart. 2001. Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* **104**:923–935.
- Allan, V. 1996. Motor proteins: a dynamic duo. *Curr. Biol.* **6**:630–633.
- Banks, J. D., and R. Heald. 2001. Chromosome movement: dynein-out at the kinetochore. *Curr. Biol.* **11**:R128–R31.
- Beckwith, S. M., C. H. Roghi, B. Liu, and N. Ronald Morris. 1998. The “8-kD” cytoplasmic dynein light chain is required for nuclear migration and for dynein heavy chain localization in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **143**:1239–1247.
- Berlin, V., C. A. Styles, and G. R. Fink. 1990. BIK1, a protein required for microtubule function during mating and mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*, colocalizes with tubulin. *J. Cell Biol.* **111**:2573–2586.
- Berrueta, L., J. S. Tirnauer, S. C. Schuyler, D. Pellman, and B. E. Bierer. 1999. The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynein complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr. Biol.* **9**:425–428.
- Blangy, A., L. Arnaud, and E. A. Nigg. 1997. Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynein subunit p150. *J. Biol. Chem.* **272**:19418–19424.
- Bloom, K. 2001. Nuclear migration: cortical anchors for cytoplasmic dynein. *Curr. Biol.* **11**:326–329.
- Brunner, D., and P. Nurse. 2000. CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**:695–704.
- Burkhardt, J. K., C. J. Echeverri, T. Nilsson, and R. B. Vallee. 1997. Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynein complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* **139**:469–484.
- Busson, S., D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre, and J. R. De Mey. 1998. Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol.* **8**:541–544.
- Cahana, A., T. Escamez, R. S. Nowakowski, N. L. Hayes, M. Giacobini, A. von Holst, O. Shmueli, T. Sapir, S. K. McConnell, W. Wurst, S. Martinez, and O. Reiner. 2001. Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:6429–6434.
- Carminati, J. L., and T. Stearns. 1997. Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J. Cell Biol.* **138**:629–641.
- Caspi, M., R. Atlas, A. Kantor, T. Sapir, and O. Reiner. 2000. Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum. Mol. Genet.* **9**:2205–2213.
- Chenn, A., J. E. Braisted, S. K. McConnell, and D. D. M. O’Leary. 1997. Development of the cerebral cortex: mechanisms controlling cell fate, laminar and areal patterning, and axonal connectivity, p. 440–473. *In* W. M. Cowan, T. M. Jessell, and S. L. Zipursky (ed.), *Molecular and cellular approaches to neural development*. Oxford University Press, New York, N.Y.
- Clark, I. B., and D. I. Meyer. 1999. Overexpression of normal and mutant Arp1alpha (centractin) differentially affects microtubule organization during mitosis and interphase. *J. Cell Sci.* **112**:3507–3518.
- De Zeeuw, C. L., C. C. Hoogenraad, E. Goedknegt, E. Hertzberg, A. Neubauer, F. Grosveld, and N. Galjart. 1997. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron* **19**:1187–1199.
- Diamantopoulos, G. S., F. Perez, H. V. Goodson, G. Batelier, R. Melki, T. E. Kreis, and J. E. Rickard. 1999. Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J. Cell Biol.* **144**:99–112.
- Dujardin, D., U. I. Wacker, A. Moreau, T. A. Schroer, J. E. Rickard, and J. R. De Mey. 1998. Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J. Cell Biol.* **141**:849–862.
- Earnshaw, W. C., H. Ratrie III, and G. Stetten. 1989. Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on a stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma* **98**:1–12.
- Earnshaw, W. C., and N. Rothfield. 1985. Identification of a family of human centromere proteins using autoimmune sera from patients with scleroderma. *Chromosoma* **91**:313–321.
- Echeverri, C. J., B. M. Paschal, K. T. Vaughan, and R. B. Vallee. 1996. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J. Cell Biol.* **132**:617–633.
- Evan, G. I., G. K. Lewis, G. Ramsay, and J. M. Bishop. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol. Cell. Biol.* **5**:3610–3616.
- Faulkner, N. E., D. L. Dujardin, C. Y. Tai, K. T. Vaughan, C. B. O’Connell, Y. Wang, and R. B. Vallee. 2000. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat. Cell Biol.* **2**:784–791.
- Fujiwara, T., K. Tanaka, E. Inoue, M. Kikyo, and Y. Takai. 1999. Bni1p regulates microtubule-dependent nuclear migration through the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:8016–8027.
- Geiser, J. R., E. J. Schott, T. J. Kingsbury, N. B. Cole, L. J. Totis, G. Bhattacharyya, L. He, and M. A. Hoyt. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* genes required in the absence of the CIN8-encoded spindle motor act in functionally diverse mitotic pathways. *Mol. Biol. Cell* **8**:1035–1050.
- Goode, B. L., D. G. Drubin, and G. Barnes. 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:63–71.
- Gripovic, L., J. M. Volosky, and T. C. Keller III. 1998. Cloning and expression of chicken CLIP-170 and restin isoforms. *Gene* **206**:195–208.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov, and R. Brent. 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**:791–803.
- Han, G., B. Liu, J. Zhang, W. Zuo, N. R. Morris, and X. Xiang. 2001. The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr. Biol.* **11**:1–20.
- Hoffman, D. B., C. G. Pearson, T. J. Yen, B. J. Howell, and E. D. Salmon. 2001. Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at ptk1 kinetochores. *Mol. Biol. Cell* **12**:1995–2009.
- Hoffmann, B., W. Zuo, A. Liu, and N. R. Morris. 2001. The LIS1 related protein NUDF of *Aspergillus nidulans* and its interaction partner NUDE bind directly to specific subunits of dynein and dynactin and to  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tubulin. *J. Biol. Chem.* **16**:16.
- Hoogenraad, C. C., A. Akhmanova, F. Grosveld, C. I. De Zeeuw, and N. Galjart. 2000. Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J. Cell Sci.* **113**:2285–2297.
- Hyman, A. 1989. Centrosome movement in the early divisions of *Caenorhabditis elegans*: a cortical site determining centrosome position. *J. Cell Biol.* **109**:1185–1193.
- Kirschner, M., and T. Mitchison. 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **45**:329–342.
- Klempner, K. H., H. Arnold, and H. Biedenkapp. 1989. Activation of transcription by v-myb: evidence for two different mechanisms. *Genes Dev.* **3**:1582–1589.
- Langanger, G., J. De Mey, and H. Adam. 1983. 1,4-Diazobicyclo-(2,2,2)-octane (DABCO) retards the fading of immunofluorescence preparations. *Mikroskopie* **40**:237–241.
- Lee, L., J. S. Tirnauer, J. Li, S. C. Schuyler, J. Y. Liu, and D. Pellman. 2000. Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science* **287**:2260–2262.
- Lin, H., P. de Carvalho, D. Kho, C.-Y. Tai, P. Pierre, G. R. Fink and D. Pellman. 2001. Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment. *J. Cell Biol.* **155**:1173–1184.
- Liu, Z., R. Steward, and L. Luo. 2000. *Drosophila* Lis1 is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nat. Cell Biol.* **2**:776–783.
- Liu, Z., T. Xie, and R. Steward. 1999. Lis1, the *Drosophila* homolog of a human lissencephaly disease gene, is required for germline cell division and oocyte differentiation. *Development* **126**:4477–4488.
- Maney, T., L. M. Ginkel, A. W. Hunter, and L. Wordeman. 2000. The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view. *Int. Rev. Cytol.* **194**:67–131.
- McGrail, M., and T. S. Hays. 1997. The microtubule motor cytoplasmic dynein is required for spindle orientation during germline cell divisions and oocyte differentiation in *Drosophila*. *Development* **124**:2409–2419.
- Merdes, A., and J. De Mey. 1990. The mechanism of kinetochore-spindle attachment and polewards movement analyzed in PtK2 cells at the prophase-prometaphase transition. *Eur. J. Cell Biol.* **53**:313–325.
- Miller, R. K., K. K. Heller, L. Frisen, D. L. Wallack, D. Loayza, A. E. Gammie, and M. D. Rose. 1998. The kinesin-related proteins, Kip2p and Kip3p, function differently in nuclear migration in yeast. *Mol. Biol. Cell* **9**:2051–2068.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. 2000. The dynamic behavior

- of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr. Biol.* **10**:865–868.
46. **Morris, N. R., V. P. Efimov, and X. Xiang.** 1998. Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol.* **8**:467–470.
  47. **Morris, S. M., U. Albrecht, O. Reiner, G. Eichele, and L.-Y. Yu-Lee.** 1998. The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. *Curr. Biol.* **8**:603–606.
  48. **Ohkura, H., I. M. Hagan, and D. M. Glover.** 1995. The conserved Schizosaccharomyces pombe kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. *Genes Dev.* **9**:1059–1073.
  49. **Perez, F., G. S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T. E. Kreis.** 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell* **96**:517–527.
  50. **Pierre, P., R. Pepperkok, and T. E. Kreis.** 1994. Molecular characterization of two functional domains of CLIP-170 in vivo. *J. Cell Sci.* **107**:1909–1920.
  51. **Pierre, P., J. Scheel, J. E. Rickard, and T. E. Kreis.** 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* **70**:887–900.
  52. **Reiner, O.** 2000. LIS1: let's interact sometimes. . . (part 1). *Neuron* **28**:633–636.
  53. **Reiner, O., R. Carrozzo, Y. Shen, M. Whenert, F. Faustinella, W. B. Dobyns, C. T. Caskey, and D. H. Ledbetter.** 1993. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein  $\beta$ -subunit-like repeats. *Nature* **364**:717–721.
  54. **Rickard, J. E., and T. E. Kreis.** 1991. Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **266**:17597–17605.
  - 54a. **Rickard, J. E., and T. E. Kreis.** 1996. CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.* **6**:178–183.
  55. **Rieder, C. L., and S. P. Alexander.** 1990. Kinetochores are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to the spindle in newt lung cells. *J. Cell Biol.* **110**:81–95.
  56. **Rieder, C. L., and E. D. Salmon.** 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol.* **8**:310–318.
  57. **Sapir, T., A. Cahana, R. Seger, S. Nekhai, and O. Reiner.** 1999. LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *Eur. J. Biochem.* **265**:181–188.
  58. **Sapir, T., M. Elbaum, and O. Reiner.** 1997. Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J.* **16**:6977–6984.
  59. **Sapir, T., D. Horesh, M. Caspi, R. Atlas, H. A. Burgess, S. Grayer Wolf, F. Francis, J. Chelly, M. Elbaum, S. Pietrovski, and O. Reiner.** 2000. Doublecortin mutations cluster in evolutionary conserved functional domains. *Hum. Mol. Genet.* **5**:703–712.
  60. **Sasaki, S., A. Shionoya, M. Ishida, M. Gambello, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsune.** 2000. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron* **28**:681–696.
  61. **Savino, T. M., J. Gebrane-Younes, J. De Mey, J. B. Sibarita, and D. Hernandez-Verdun.** 2001. Nucleolar assembly of the rRNA processing machinery in living cells. *J. Cell Biol.* **153**:1097–1110.
  62. **Scheel, J., P. Pierre, J. E. Rickard, G. S. Diamantopoulos, C. Valetti, F. G. van der Goot, M. Haner, U. Aebi, and T. E. Kreis.** 1999. Purification and analysis of authentic CLIP-170 and recombinant fragments. *J. Biol. Chem.* **274**:25883–25891.
  63. **Schroer, T. A.** 2001. Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:92–96.
  64. **Schuyler, S. C., and D. Pellman.** 2001. Microtubule “plus-end-tracking proteins.” The end is just the beginning. *Cell* **105**:421–424.
  65. **Schuyler, S. C., and D. Pellman.** 2001. Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play. *J. Cell Sci.* **114**:247–255.
  66. **Shah, J. V., and D. W. Cleveland.** 2000. Waiting for anaphase: Mad2 and the spindle assembly checkpoint. *Cell* **103**:997–1000.
  67. **Sheffield, P., S. Garrard, M. Caspi, J. Aoki, K. Inoue, U. Derewenda, B. Suter, O. Reiner, and Z. S. Derewenda.** 2000. Homologues of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits of mammalian brain platelet-activating factor acetylhydrolase Ib in the *Drosophila melanogaster* genome. *Proteins* **39**:1–8.
  68. **Skibbens, R. V., and P. Hieter.** 1998. Kinetochores and the checkpoint mechanism that monitors for defects in the chromosome segregation machinery. *Annu. Rev. Genet.* **32**:307–337.
  69. **Skop, A. R., and J. G. White.** 1998. The dynactin complex is required for cleavage plane specification in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Curr. Biol.* **8**:1110–1116.
  70. **Smith, D. S., M. Niethammer, R. Ayala, Y. Zhou, M. J. Gambello, A. Wynshaw-Boris, and L. H. Tsai.** 2000. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat. Cell Biol.* **2**:767–775.
  71. **Theurkauf, W. E.** 1997. Oocyte differentiation: a motor makes a difference. *Curr. Biol.* **7**:548–551.
  72. **Thrower, D. A., M. A. Jordan, and L. Wilson.** 1996. Modulation of CENP-E organization at kinetochores by spindle microtubule attachment. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **35**:121–133.
  73. **Tirnauer, J. S., and B. E. Bierer.** 2000. EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J. Cell Biol.* **149**:761–766.
  74. **Valetti, C., D. M. Wetzel, M. Schrader, M. J. Hasbani, S. R. Gill, T. E. Kreis, and T. A. Schroer.** 1999. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynactin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol. Biol. Cell* **10**:4107–4120.
  75. **Vallee, R. B., and M. P. Sheetz.** 1996. Targeting of motor proteins. *Science* **271**:1539–1544.
  76. **Vallee, R. B., C. Tai, and N. E. Faulkner.** 2001. LIS1: cellular function of a disease-causing gene. *Trends Cell Biol.* **11**:155–160.
  77. **Vaughan, K. T., S. H. Tynan, N. E. Faulkner, C. J. Echeverri, and R. B. Vallee.** 1999. Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J. Cell Sci.* **112**:1437–1447.
  78. **Vaughan, P. S., J. D. Leszyk, and K. T. Vaughan.** 2001. Cytoplasmic dynein intermediate chain phosphorylation regulates binding to dynactin. *J. Biol. Chem.* **276**:26171–26179.
  79. **Willins, D. A., B. Liu, X. Xiang, and N. R. Morris.** 1997. Mutations in the heavy chain of cytoplasmic dynein suppress the nudF nuclear migration mutation of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **255**:194–200.
  80. **Xiang, X., S. M. Beckwith, and N. R. Morris.** 1994. Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:2100–2104.
  81. **Xiang, X., G. Han, D. A. Winkelmann, W. Zuo, and N. R. Morris.** 2000. Dynamics of cytoplasmic dynein in living cells and the effect of a mutation in the dynactin complex actin-related protein Arp1. *Curr. Biol.* **10**:603–606.
  82. **Xiang, X., A. H. Osmani, S. A. Osmani, M. Xin, and N. R. Morris.** 1995. NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol. Biol. Cell* **6**:297–310.
  83. **Yeaman, C., K. K. Grindstaff, and W. J. Nelson.** 1999. New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity. *Physiol. Rev.* **79**:73–98.

---

## II. LIS1 : CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway (Coquelle *et al.*, 2002) et résultats complémentaires :

### A. Résultats :

#### 1. Co-distribution de LIS1 et CLIP-170 :

Comme nous venons de le voir, LIS1 et la CLIP-170 ont chacune été mise en évidence comme colocalisant avec le complexe moteur dynéine/dynactine (Dujardin *et al.*, 1998; Faulkner *et al.*, 2000). La colocalisation de LIS1 avec la CLIP-170 était un pré-requis à l'étude de l'interaction potentielle entre les deux protéines. Nous avons donc caractérisé la localisation relative de la CLIP-170 et de LIS1 (**figure 1 de l'article**). En prophase, les deux protéines se co-distribuent sur l'enveloppe nucléaire où le complexe D/D participe à la NEB (Salina *et al.*, 2002). LIS1 et la CLIP-170 colocalisent aux KTs pré-métaphasiques non associés au fuseau de division. A partir de la prémétaphase tardive, les deux protéines sont présentes sur les MTs astériens et les sites corticaux, où notre équipe a précédemment mis en évidence le complexe moteur (Busson *et al.*, 1998). Cette étude constitue la première localisation de la CLIP-170 aux sites corticaux. Les mêmes localisations ont pu être observées au sein de cellules CO7 et MDCK en culture.

L'équivalent fonctionnel de LIS1 chez *Aspergillus Nidulans* adopte aux bouts (+) des MTs le comportement d'une +TIP (Han *et al.*, 2001). Bien que l'équipe d'Orly Reiner ait mis en évidence LIS1 comme s'associant de manière discontinue le long des MTs, la protéine restait à localiser aux bouts (+) (Sapir *et al.*, 1999a). Nous avons utilisé une chimère LIS1-DsRed pour mettre en évidence cette localisation. Son expression modérée n'engendre pas de phénotype. LIS1-DsRed colocalise avec la CLIP-170 aux bouts (+), l'identifiant comme une +TIP.

#### 2. LIS1 et la CLIP-170 interagissent directement :

Comme nous l'avons développé en introduction, le domaine fonctionnel de la CLIP-170 impliqué dans sa co-distribution avec le complexe D/D réside dans la portion carboxy-terminale de la protéine. Elle comporte deux motifs de type "doigt de zinc", caractérisé au sein d'autres protéines comme responsables d'interactions. De même, LIS1 comporte 7



répétitions de type WD, pouvant être responsables de telles interactions. Nous avons entrepris de tester l'implication de ces motifs dans l'interaction entre la CLIP-170 et LIS1.

Le test double hybride mené en collaboration avec l'équipe d'Orly Reiner (Weizmann Institute, Israël) révèle une association directe entre le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 et LIS1 entière. L'utilisation de formes tronquées ou mutées pour le premier (proximal) et/ou le second (distal) des doigts de zinc ont permis de mettre en évidence leur participation différentielle à l'interaction. Le second doigt de zinc est nécessaire. Ces données ont été confirmées par chromatographie d'affinité, utilisant des chimères GST des formes tronquées ou mutées.

Par opposition à la CLIP-170, nous n'avons pu identifier un unique domaine responsable de l'interaction au sein de LIS1. Les différents domaines de la protéine, exprimée en lysat de réticulocytes, présentent chacun une faible affinité pour le domaine carboxy-terminale de la CLIP-170, inférieure à celle de la protéine entière. Néanmoins, les domaines amino-terminal et WD5 à 7 semblent les plus affins pour la CLIP-170.

Cette interaction a lieu *in vivo*, comme l'indique la co-immunoprécipitation de la CLIP-170 et LIS1, à partir d'extraits de cerveau de souris ou de cellules HeLa (**figure 2 de l'article**).

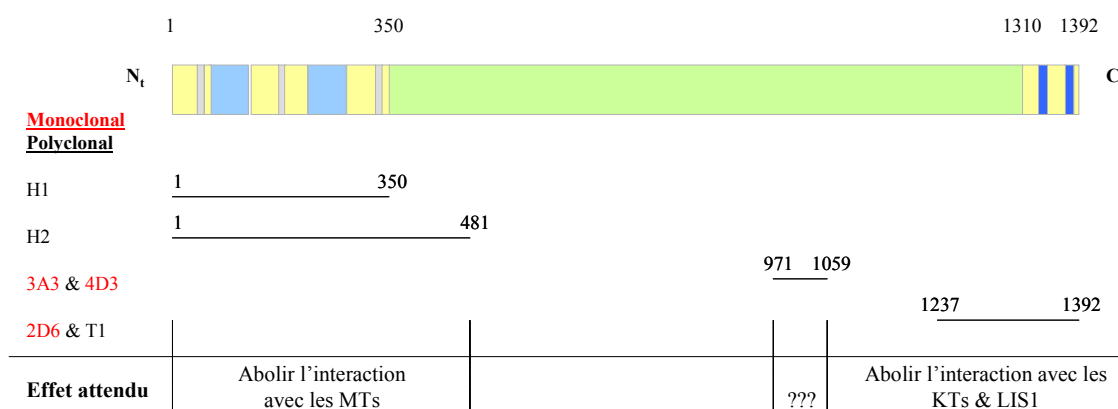
### ***3. L'adressage de LIS1 aux kinétochores dépend du complexe dynéine/dynactine :***

Au sein du laboratoire, il a été montré que l'adressage de la CLIP-170 aux KT's dépend de l'intégrité du complexe D/D (Dujardin *et al.*, 1998). LIS1 est capable d'interagir avec la CLIP-170, la DHC, la DIC et la p50 (Sasaki *et al.*, 2000; Tai *et al.*, 2002). Nous avons entrepris de surexprimer la p50 afin de dissocier le complexe D/D (Echeverri *et al.*, 1996) et d'établir son influence sur l'adressage de LIS1 aux KT's. Dans ces conditions, LIS1 n'est plus associée aux structures. L'adressage de LIS1 aux KT's requiert donc l'intégrité du complexe D/D (**figure 3 de l'article**).

### ***4. L'adressage de la CLIP-170 aux KT's dépend de son domaine de liaison à LIS1 :***

Le domaine carboxy-terminal est nécessaire à l'adressage de la CLIP-170 aux KT's pré-métaphasiques (Dujardin *et al.*, 1998). Nous avons pu confirmer ces données en

microinjectant un anticorps polyclonal (T1A, **figures R3 & R4**, données non publiées) dans des cellules HeLa synchronisées par double blocage par un excès de thymidine (voir la section "matériels et méthodes"). Les cellules ont été injectées en interphase, afin qu'elles entrent en mitose en présence de l'anticorps. Avant fixation, les cellules ont été traitées au nocodazole. En dépolymérisant les MTs, cette drogue bloque les cellules en pseudo-prémétaphase. Il a été démontré que le nocodazole modifie la structure du KT : la corona s'étend, en augmentant le recrutement de ses constituants (Hoffman *et al.*, 2001). Malgré ces conditions extrêmes, en présence de T1A la CLIP-170 n'est plus recrutée aux KTs (comparer les vignettes b et f de la **figure R4**). Cette expérience constitue un bon témoin de l'efficacité de la délocalisation de la CLIP-170 due à l'anticorps. Les vignettes j et n indiquent que la localisation de la sous-unité p150<sup>Glued</sup> du complexe dynactine reste inchangée. Pour référence, les régions centromériques sont mises en évidence par un sérum auto-immun humain de patients CREST (calcinosis, Raynaud's phenomenon, esophageal dysmotility, sclerodactyly, telangiectasia, (Tan *et al.*, 1980)).

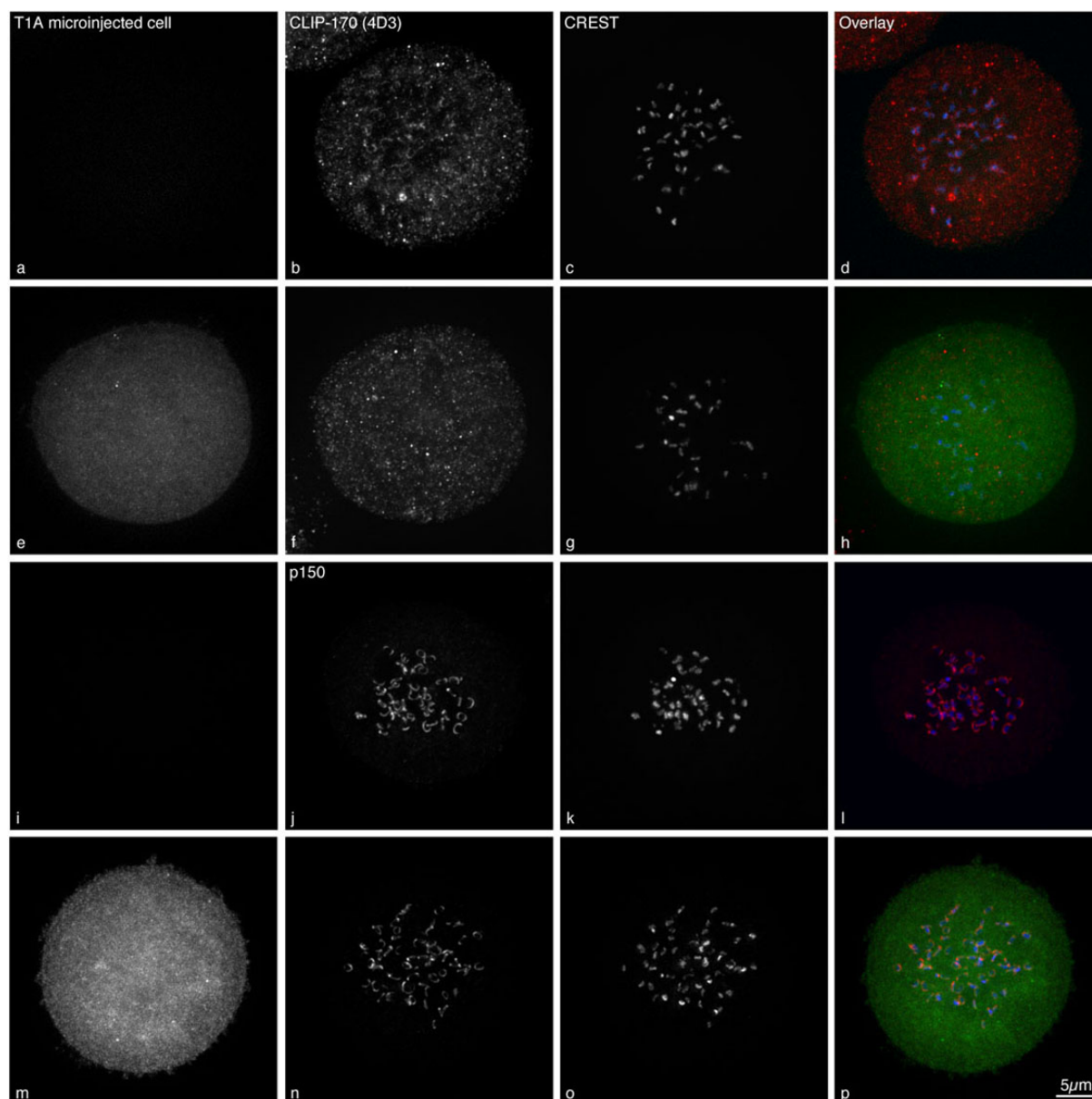


**Figure R3 :**

Epitopes reconnus par les anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre la CLIP-170. Effets attendus suite à leur microinjection.

Référence des anticorps : H1(B) (Dujardin D et De Mey JR, non publié), H2(A) (Dujardin *et al.*, 1998), 3A3 et 4D3 (Rickard et Kreis, 1991), 2D6 (Pierre *et al.*, 1992), T1(A) (Coquelle *et al.*, 2002).

L'utilisation de chimères entre la GFP et les différentes formes du fragment carboxy-terminal de la CLIP-170 a permis de définir son domaine minimum d'adressage aux KTs (**figure 3 de l'article**). Le fragment Z1+2 constitué des deux motifs "doigt de zinc" suffit à adresser la GFP aux KTs prémétaphasiques. Le "doigt de zinc" distal, le plus conservé des deux, est requis pour la localisation de la GFP sur ces structures. Les mêmes expériences réalisées avec les formes tronquées/mutées du domaine carboxy-terminal, replacées au sein de



**Figure R4 :**

***La microinjection d'anticorps dirigés contre le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 provoque sa dissociation des kinétochores de cellules HeLa traitées au nocodazole. La distribution de la p150<sup>Glued</sup> reste inchangée.***

Les images présentées sont le produit de la projection à intensité maximale de piles de sections optiques, acquises par microscopie 3D à déconvolution.

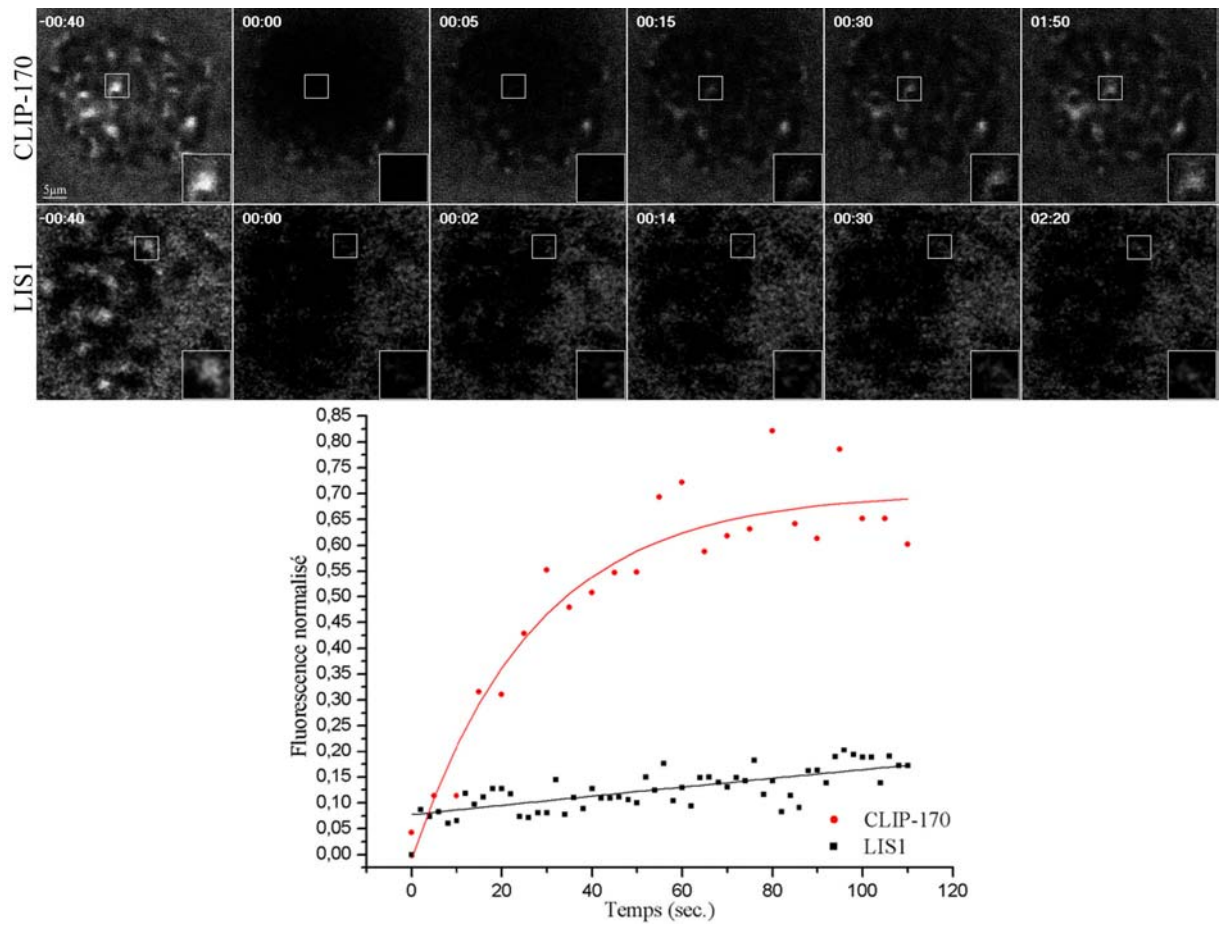
la séquence complète de la CLIP-170, ont permis de déterminer que son domaine d'adressage aux KTs coïncide avec le domaine d'interaction avec LIS1.

*Nous postulons que l'adressage de la CLIP-170 aux KTs dépend de son interaction avec LIS1 : elle constitue le lien jusqu'alors manquant entre le complexe D/D et la CLIP-170.*

### **5. Dynamique d'association de la CLIP-170 et de LIS1 aux KTs :**

Nous avons étudié la dynamique du renouvellement de la CLIP-170 et de LIS1 aux KTs de cellules HeLa traitées au nocodazole. Les paramètres de cette dynamique ont été déterminés en mettant en œuvre la technique de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) en collaboration avec Jean Salamero (Institut Curie, UMR 144). Elle consiste en un photoblanchiment d'une zone de la cellule contenant la structure d'intérêt, suivi par l'enregistrement par vidéomicroscopie confocale du retour de fluorescence sur la structure (pour revues, voir (Bastiaens et Pepperkok, 2000; White et Stelzer, 1999)). Afin d'analyser les données obtenues, j'ai programmé un outil de quantification fonctionnant au sein du logiciel Metamorph (Universal Imaging), décrit dans la section "matériels et méthodes". La **figure R5** (données non publiées) présente les résultats obtenus.

Le panneau supérieur de la figure présente une séquence de FRAP réalisée sur cellules HeLa exprimant soit la chimère GFP-CLIP-170, soit la chimère LIS1-GFP. La vignette notée -00:40 sec. représente la cellule avant photoblanchiment. On peut y distinguer plusieurs structures brillantes, dont une est encadré, correspondant à la CLIP-170 ou LIS1 associée aux KTs. La vignette notée 00:00 sec. correspond à la première image acquise après photoblanchiment de la zone contenant les KTs. Au bout d'une minute et cinquante secondes l'image obtenue pour la CLIP-170 indique un retour de fluorescence quasi-total. En revanche, après un intervalle de temps plus long, il apparaît que LIS1-GFP ne soit pas en mesure de retrouver son niveau initial de fluorescence aux KTs (voir les cinétiques correspondantes, graphique de la **figure R5**). Le photoblanchiment induit une inactivation de la GFP, réduisant la quantité de chimère visible. L'analyse de données issues de plusieurs expériences indépendante a permis de déterminer que cette absence de "recovery" n'est pas la conséquence d'un excès de photoblanchiment. Dans ces conditions, la demi-vie déterminée pour LIS1 n'a pas une grande signification (9 KTs, 3 cellules). Les données extrapolées à partir des données expérimentales implémentées dans l'équation théorique (voir la section "matériels et méthodes") rendent compte d'un retour de fluorescence faible, égal à 20% (différence entre la fluorescence déterminée immédiatement après photoblanchiment et celle correspondant au



**Figure R5 :**  
*Analyse par FRAP de la demi-vie de la CLIP-170 et de LIS1 aux kinétochores de cellules HeLa traitées au nocodazole.*

Les images présentées sont de simples coupes optiques, acquises par microscopie confocale.

retour maximal). En revanche, la demi-vie de la CLIP-170 a pu être déterminée et est égale à  $21 \pm 11$  sec. (14 KT, 5 cellules). Le retour de fluorescence moyen est de 64%. Ces données indiquent que la protéine subit un renouvellement rapide et permanent aux KT.

*La différence de dynamique entre les deux protéines aux KT laisse penser que LIS1 agit comme un récepteur permanent pour la CLIP-170. Ces résultats indiquent que l'interaction CLIP-170/LIS1 n'est pas requise pour l'adressage de la première aux KT. En revanche, LIS1 est nécessaire pour son ancrage sur ces structures.*

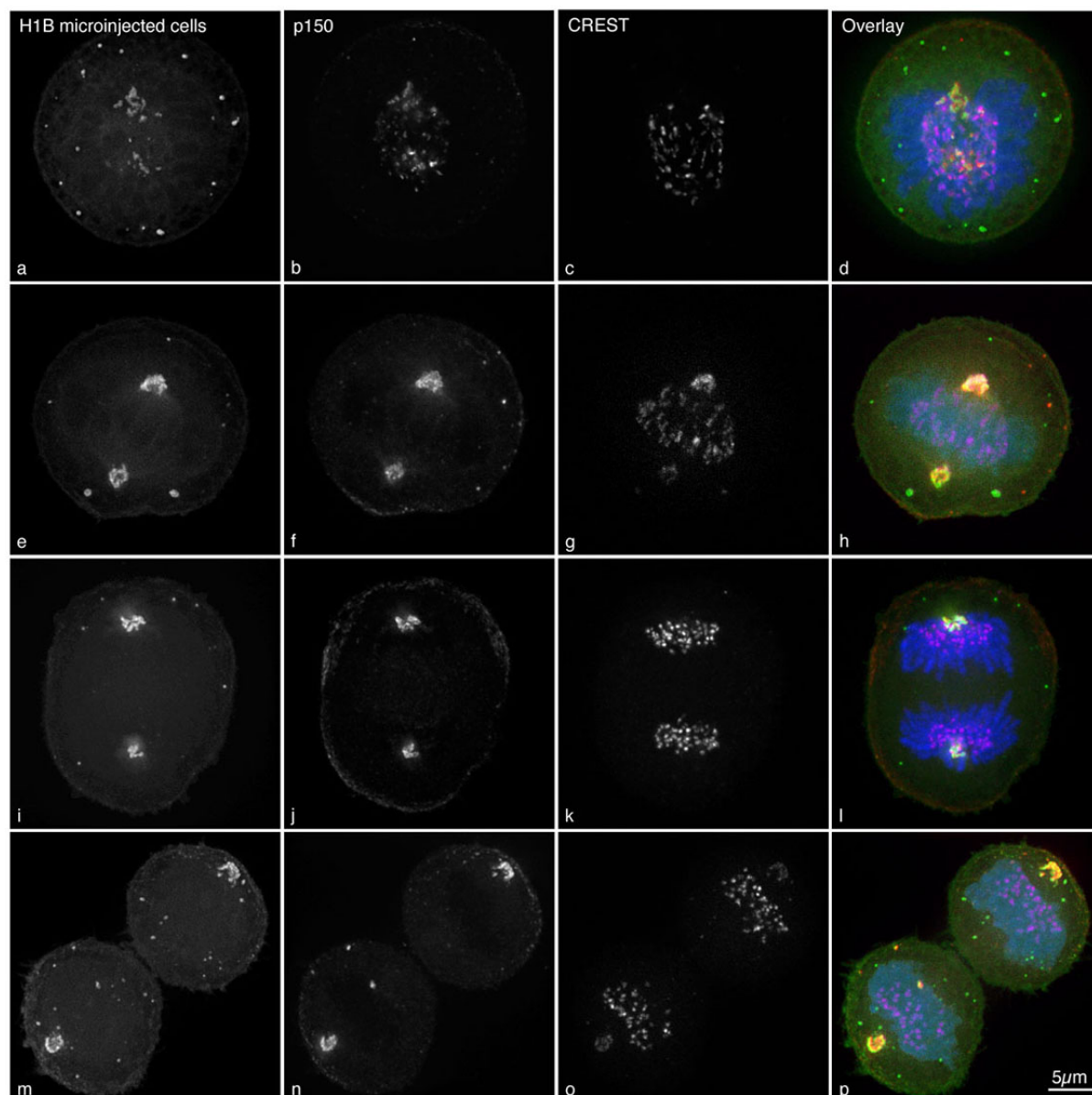
### **6. La CLIP-170 ne semble pas requise à la complétion de la mitose :**

Afin de perturber le fonctionnement de la CLIP-170 en mitose, nous avons entrepris des expériences de microinjection d'anticorps. Comme décrit précédemment, la microinjection a été réalisée sur cellules synchronisées en interphase. L'anticorps utilisé, H1B, est dirigé contre le domaine amino-terminal de la protéine, comportant les deux motifs CAP-Gly. Nous espérions pouvoir masquer ces domaines, tout en conservant l'adressage de la protéine aux KT. Nous avons été surpris de délocaliser la protéine (données non illustrées). Pour la concentration d'anticorps utilisée ( $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), la CLIP-170 est délocalisée sur des agrégats coiffant les pôles du fuseau. Dans ces conditions, la  $p150^{\text{Glued}}$  se localise toujours aux KT, comme constaté en observant T1A. Elle est également présente aux sites corticaux. On note également la présence de la  $p150^{\text{Glued}}$  sur les agrégats contenant la CLIP-170 (**figure R6**, vignettes f, i et n). La **figure R6** (données non publiées) met en évidence que les cellules sont capables d'entrer et de sortir de mitose sans que la CLIP-170 soit adressée aux KT.

*Une hypothèse évoquée pour la fonction de la CLIP-170 faisait référence à un rôle potentiel dans la capture tangentielle des MTs en prémétaphase. Un dysfonctionnement dans ce processus peut engendrer une aneuploïdie par défaut d'attachement de chromosomes aux MTs du fuseau de division. Dans le cadre des micro-injections d'anticorps présentées ici, nous n'avons jamais observé de pertes chromosomes, comme observé après microinjection d'anticorps dirigés contre LIS1 (Faulkner et al., 2000).*

### **7. L'adressage de LIS1 aux bouts (+) des MTs dépend de la CLIP-170 :**

Afin d'évaluer le rôle de la CLIP-170 dans l'adressage du complexe D/D aux bouts (+) des MTs, nous avons perturbé son adressage par microinjection des anticorps H1B et T1A (**figures R7 et R8**, données non publiées). Notre but était d'empêcher l'association de la CLIP-170 en masquant à l'aide de H1B ses domaines CAP-Gly ou de bloquer son interaction

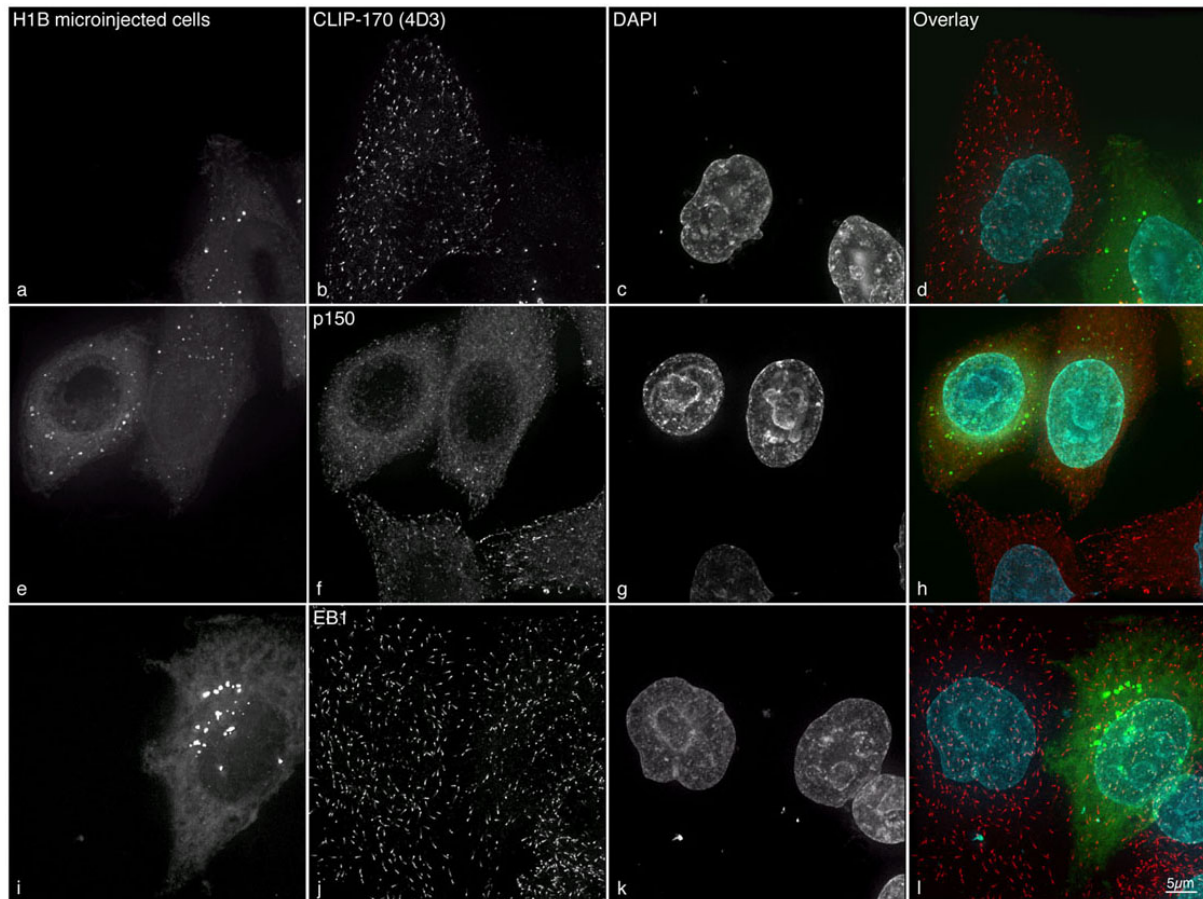


**Figure R6 :**

***La microinjection d'anticorps dirigés contre le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 provoque sa dissociation des kinétochores de cellules HeLa non traitées. Les cellules demeurent capables de progresser au travers des différentes étapes de la mitose.***

Les images présentées sont le produit de la projection à intensité maximale de piles de sections optiques, acquises par microscopie 3D à déconvolution.

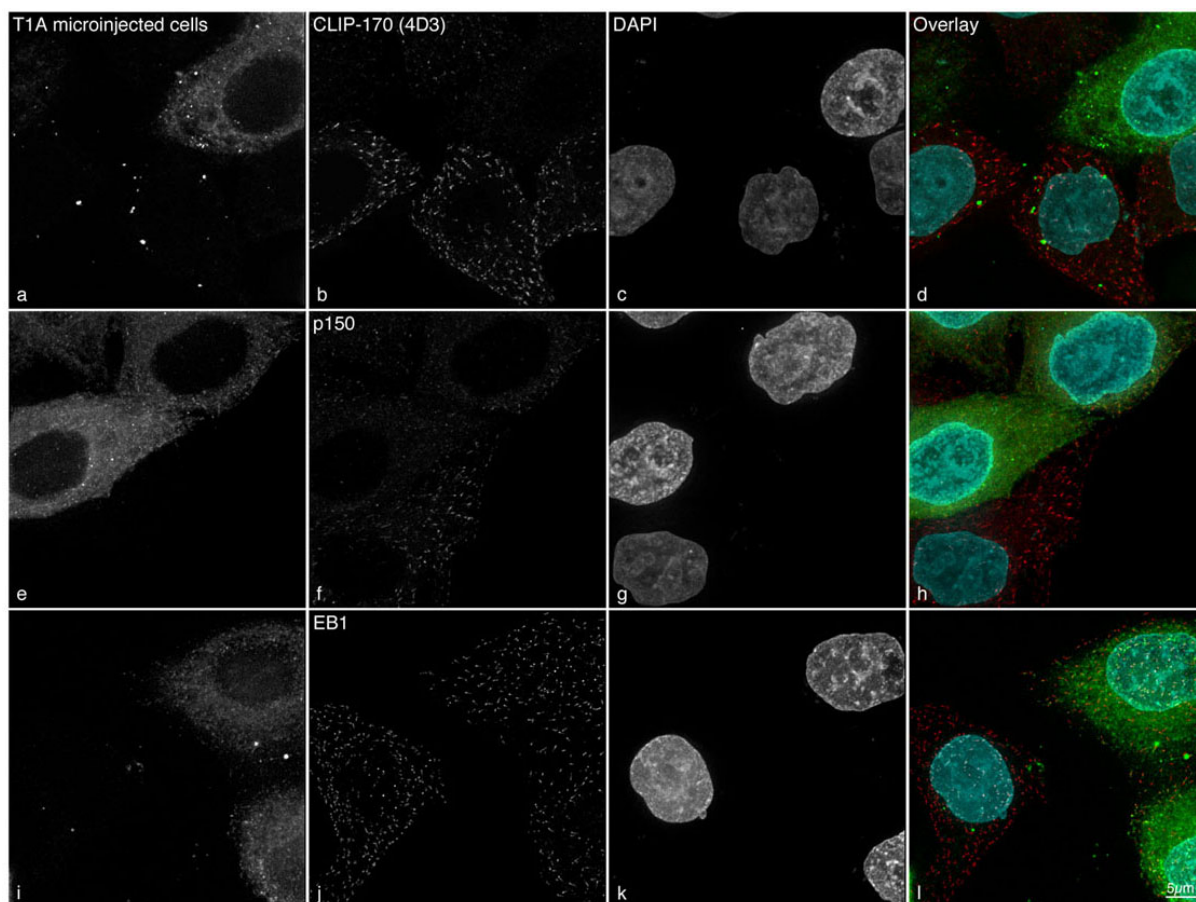




**Figure R7 :**  
**La microinjection d'anticorps dirigés contre le domaine amino-terminal de la CLIP-170**  
**provoque sa dissociation ainsi que celle de la  $p150^{\text{Glued}}$  du bout (+) des microtubules. La**  
**distribution d'EB1 est inchangée.**

Les images présentées sont le produit de la projection à intensité maximale de piles de sections optiques, acquises par microscopie 3D à déconvolution.



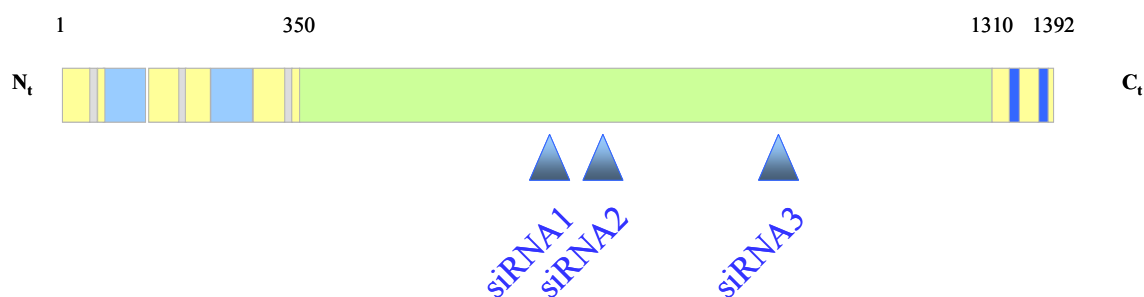


**Figure R8 :**  
**La microinjection d'anticorps dirigés contre le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170**  
**provoque la dissociation de la p150<sup>Glued</sup> et de la CLIP-170 du bout (+) des microtubules. La**  
**distribution d'EB1 est inchangée.**

Les images présentées sont le produit de la projection à intensité maximale de piles de sections optiques, acquises par microscopie 3D à déconvolution.

avec LIS1 en masquant ses domaines en "doigt de zinc" avec T1A. Pour la concentration d'anticorps utilisée (2 $\mu$ g/ $\mu$ l), le phénotype obtenu est le même pour les deux anticorps : la CLIP-170 ne s'associe plus avec les MTs (**figures R7 et R8**, vignettes b). Dans ces conditions, p150<sup>Glued</sup> est délocalisée (**figures R7 et R8**, vignettes f), comme attendu (Valetti *et al.*, 1999), et EB1 demeure associée aux bouts (+) (**figures R7 et R8**, vignettes i).

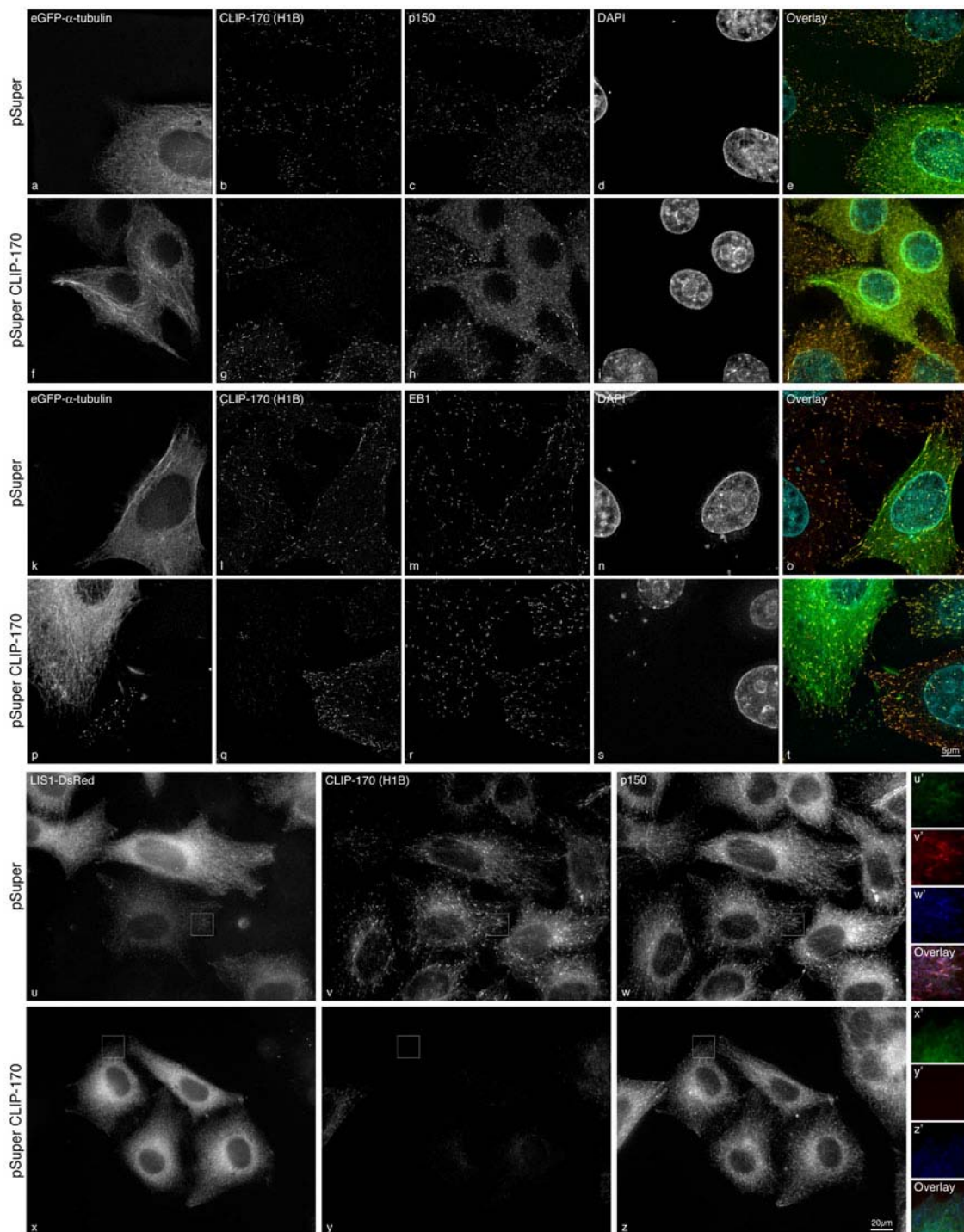
Nous avons également testé l'adressage de la p150<sup>Glued</sup> et de LIS1 aux bouts (+) en absence de CLIP-170 (**figures R9 et R10**, données non publiées). La technique des siRNA permet de fortement réduire/supprimer l'expression de gènes cibles, en dirigeant l'ARNm correspondant vers une voie de dégradation ((Elbashir *et al.*, 2001a; Elbashir *et al.*, 2001b), pour revue, voir (Hannon, 2002)). La technique classiquement utilisée consiste à transfecter les cellules en culture avec le duplexe de siRNA. Néanmoins, elle impose de renouveler régulièrement cette opération afin de maintenir leur effet à long terme. Nous avons opté pour un système permettant une production continue du siRNA par la cellule hôte, en utilisant le plasmide approprié, pSuper (Brummelkamp *et al.*, 2002). L'analyse de la séquence de l'ADNc codant la CLIP-170 a révélé la présence de 3 cibles potentielles des siRNA (**figure R9**). Toutes sont situées dans la séquence codant pour le domaine en coiled-coil de la protéine. Ces trois sites sont exclusivement présents dans la CLIP-170, comme l'atteste la recherche effectuée sur les banques de données de séquences.



**Figure R9 :**

Localisation des domaines de la CLIP-170 codés par les cibles des trois siRNA.

Afin d'identifier les cellules porteuses du plasmide codant pour le siRNA, des cotransfections ont été réalisées avec une construction codant la GFP- $\alpha$ -tubuline ou LIS1-DsRed. Les proportions des deux constructions utilisées (ratio 1:10) permettent de s'assurer que tout cellule exprimant la construction fluorescente exprime la construction siRNA. Dans ces conditions, les trois constructions pSuper CLIP-170 1 à 3 sont capables de réduire l'expression de la CLIP-170 jusqu'à un niveau indétectable par immunofluorescence (données non illustrées).



**Figure R10 :**  
**La CLIP-170 est requise pour l'adressage de la p150<sup>Glued</sup> et de LIS1 au bout (+) des microtubules. EB1 y est adressée indépendamment.**

Les images présentées sont le produit de la projection à intensité maximale de piles de sections optiques, acquises par microscopie 3D à déconvolution.

La transfection de la construction pSuper n'engendre aucun phénotype : la CLIP-170 (vignettes b, l, v et y), la p150<sup>Glued</sup> (vignettes c, h et w), EB1 (vignettes m et r) et LIS1-Dsred (vignette u) se localisent aux bouts (+) des MTs. L'expression du siRNA1 (voir **figure R9**, et la section "matériels et méthodes") provoque une forte réduction de l'expression de la CLIP-170 (vignettes g, q et y). Dans ces conditions, la p150<sup>Glued</sup> ne se localise plus aux bouts (+) des MTs (vignette h). Lorsque le plasmide pSuper-CLIP-170 est co-exprimé avec LIS1-DsRed, le défaut de localisation de la p150<sup>Glued</sup> et de LIS1-DsRed semble moins prononcé (vignettes x et z). Dans tous les cas observé (présence/absence de la CLIP-170 aux bouts (+)), EB1 demeure correctement localisé.

*Il est important de noter que jusqu'à présent il nous a été impossible d'isoler des cellules mitotiques porteuses du plasmide pSuper-CLIP-170.*

Comme nous l'avons vu en avant-propos, la surexpression de LIS1 provoque une délocalisation des composants du complexe D/D des bouts (+) des MTs (Faulkner *et al.*, 2000). Nous avons évalué l'influence de la co-expression d'une LIS1 étiquetée (GFP ou HA) et de plusieurs formes de CLIPs sur leur adressage aux bouts (+) des MTs. Nous démontrons que l'expression de la CLIP-170 mais pas de la CLIP-115 permet l'adressage de LIS1 étiquetée aux bouts (+) des MTs (**figure 5 de l'article**). L'ajout de la séquence codant le domaine carboxy-terminal à la CLIP-115 (CLIP-115+tail) suffit à assurer l'adressage de LIS1 aux bouts (+). Dans tous ces cas, les trois partenaires de LIS1 testés (mNudE, NudEL et NudC, (Hoffmann *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 1998b; Niethammer *et al.*, 2000)) ne s'associent pas aux MTs, démontrant la spécificité de l'adressage.

### ***8. Probable régulation par phosphorylation de l'interaction entre LIS1 et la CLIP-170 :***

LIS1 a été démontrée comme pouvant s'associer de manière phosphorylation dépendante aux MTs (Sapir *et al.*, 1999a). Nous avons évalué l'implication d'une telle modification sur son interaction avec la CLIP-170. L'équipe d'Orly Reiner, avec qui nous avons collaboré à l'élaboration de cet article, disposait d'un anticorps polyclonal, reconnaissant LIS1 indépendamment de son état de phosphorylation, ainsi que d'un anticorps monoclonal, publié comme reconnaissant une forme phosphorylée de LIS1 (Sapir *et al.*, 1999a).

La CLIP-170 surexprimée est capable d'opérer un profond remaniement du cytosquelette de tubulines, entraînant la formation de fagots de MTs (Pierre *et al.*, 1994).

L'obtention de ce phénotype dépend de la présence du seul domaine amino-terminal de la protéine. Nous montrons que les fagots générés par surexpression de la CLIP-170 pleine longueur recrutent la p150<sup>Glued</sup>, Arp1 (non illustré) et les deux formes de LIS1 (**figure 5 de l'article**). La surexpression de la CLIP-170 dont le doigt de zinc distal (i.e. domaine d'interaction avec LIS1) est muté ne recrute ni la p150<sup>Glued</sup>, ni la forme phosphorylée de LIS1. En revanche, le signal obtenu avec l'anticorps polyclonal demeure, indiquant que la forme hypo/non phosphorylée de LIS1 est capable d'interagir avec les MTs indépendamment de la CLIP-170.

## **B. Matériels et méthodes :**

### ***Synchronisation de cellules :***

Les cellules HeLa destinées à la microinjection ont été mise en culture sur lamelles de type CeLLocate® (Eppendorf), comme indiqué dans l'article. Les cellules ont été synchronisé par double blocage en présence d'un excès de thymidine (Bootsma *et al.*, 1964; Thomas et Lingwood, 1975).

### ***Microinjection d'anticorps :***

Les anticorps H1B et T1A ont été concentrés jusqu'à 2 µg/µl en tampon de microinjection (TPM: 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, 100 mM KCl, 1mM MgCl, (Gorbsky *et al.*, 1998)) sur filtres à centrifuger CentriPrep® (Millipore). La microinjection a été effectuée exclusivement sur cellules interphasiques, pendant le relâchement après le second blocage thymidine au moyen de microcapillaires de borosilicate étirés, adaptés sur le système d'injection AIS2 (CellBiology Trading). Pour toutes les expériences, nous nous sommes imposé un délai maximum d'injection de 20 minutes afin d'éviter les fortes variations de température et de CO<sub>2</sub>. Les cellules ont été fixées 9 à 10 heures après relâchement, selon les procédures décrites dans l'article.

### ***Constructions :***

#### ***eGFP-CLIP-170 :***

La construction EGFP-CLIP-170 a été obtenue en liant le fragment issu de la digestion par *EcoRI* du plasmide pSG5-myc-CLIP-170 (Pierre *et al.*, 1992) au site correspondant du plasmide pEGFP-C2 (Clontech).

*pSuper-CLIP :*

Trois séquences de type (AA)GN<sub>17</sub><sup>G</sup>/C<sub>TT</sub> ont été identifiées au sein de l'ADNc de la CLIP-170 comme cibles potentielles pour les siRNAs. Les oligonucléotides (voir le tableau récapitulatif ci-après) comportant ces séquences ont été appariés (siCLIPxs avec siCLIPxr) et introduits dans le plasmide pSuper ouvert par les enzymes *HindIII* et *BglIII* selon les instructions fournies par les auteurs (Brummelkamp *et al.*, 2002). 72 heures après transfection, les trois plasmides obtenus présentent la même efficacité de réduction de l'expression de la CLIP-170, comme déterminé par immunofluorescence sur cellules HeLa.

siCLIP1s	GATCCCCGGCTACTGAAGAAAAGCTCTTCAAGAGAGAGCTTTTCTTCAGTAGCCTTTTGGAAA
siCLIP1r	AGCTTTTCCAAAAAGAGCTTTTCTTCAGTAGCCTCTCTTGAAGGCTACTGAAGAAAAGCTCGGG
siCLIP2s	GATCCCCGACTGAGACTCTGGCCTCCTTCAAGAGAGGAGGCCAGAGTCTCAGTCTTTTTGGAAA
siCLIP2r	AGCTTTTCCAAAAAGAGGCCAGAGTCTCAGTCTCTTGAAGACTGAGACTCTGGCCTCCGGG
siCLIP3s	GATCCCCGTCCAGCAGCTTTCAGCGTTCAAGAGAGCTGAAAGCTGCTGGGACTTTTTGGAAA
siCLIP3r	AGCTTTTCCAAAAACGCTGAAAGCTGCTGGGACTCTCTTGAAGTCCAGCAGCTTTCAGCGGGG

*Expériences de FRAP :*

Les cellules HeLa ont étéensemencées sur lamelles de verre de 18 mm de diamètre à une densité de 150.000 par puit de plaque 6 puits. La transfection des plasmides codant pour la EGFP-CLIP-170 ou LIS1-GFP a été réalisée en utilisant le JetPEI® (PolyTransfection). 24 à 36 heures après transfection, les cellules ont été bloquées en pseudo-prémétaphase par le nocodazole (10µM). La microscopie sur cellules vivantes a été réalisée au moyen du microscope confocal LEICA SP2, en utilisant un objectif à immersion 63x, l'ensemble microscope/préparation étant maintenu à 37°C. Avant et après le photoblanchiment, une image a été acquise toutes les 2 à 5 secondes. Chaque image (1 seul plan focal par point de temps, 512x512 pixels) a été obtenue en moyennant 3 à 4 passages du laser (raie 488nm) sur une même ligne. Le photoblanchiment a été réalisé par 2 à 3 passages du laser réglé à pleine puissance sur une zone d'intérêt contenant les KTs.

*Suivi des kinétochores et mesures de fluorescence :*

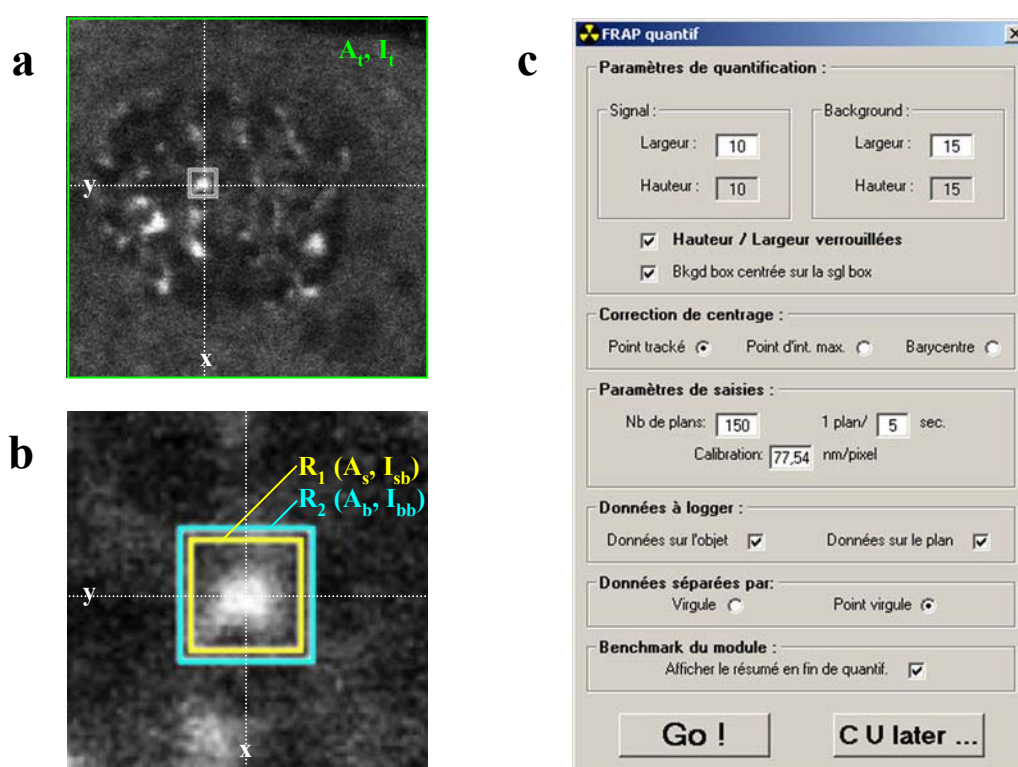
Le logiciel Metamorph a été utilisé pour mesurer la fluorescence intégrée dans une zone centrée sur chaque KT, comme décrit ci-après. Chaque KT a été suivi manuellement. Un journal a été écrit afin d'enregistrer les coordonnées x et y de chaque structure au cours du temps. Une extension du logiciel (interface présentée en **figure R11**, vignette c) a été écrite afin de placer deux régions centrées sur le point (x,y) (**figure R11**, vignettes a et b). La première région (R<sub>1</sub> d'aire A<sub>s</sub>) étroitement centrée sur le KT, a été utilisée afin de quantifier



l'intensité intégrée "brute"  $I_{sb}$  associée au KT (**figure R11 b**, carré jaune). La seconde région ( $R_2$  d'aire  $A_b$ ) est centrée sur le KT et placée autour de  $R_1$ . Son intensité intégrée est notée  $I_{bb}$ . La dernière région d'aire  $A_t$  et d'intensité  $I_t$  couvre l'ensemble du champ saisi.

**Intensités corrigées pour le photoblanchiment en cours de saisie :**

Afin de corriger les valeurs d'intensité pour le photoblanchiment affectant les cellules au cours de la saisie, toutes les intensités sont exprimées sous la forme d'une fraction de l'intensité totale  $I_t$ .  $I_s$ , définie comme le rapport  $I_{sb}/I_t$ , représente l'intensité du signal corrigée pour le photoblanchiment.  $I_b$ , définie comme le rapport  $I_{bb}/I_t$ , représente l'intensité du signal corrigée pour le photoblanchiment.



**Figure R11 :**

Analyse des données de FRAP.

**Intensités corrigées pour le bruit de fond et retour de fluorescence :**

L'espace entre  $R_2$  et  $R_1$  est utilisée pour estimer le bruit de fond local, autour du KT, permettant de définir le signal corrigé  $I$  de la structure suivie, selon l'équation 1.

$$I = I_s - \frac{(I_b - I_s) \times A_s}{A_b - A_s} \quad (\text{Equation 1}) \quad I(t) = I_{inf} - [I_{inf} - I(0)]e^{-kt} \quad (\text{Equation 2})$$

Le retour de fluorescence peut-être décrit par une fonction exponentielle donnée par l'équation 2 (voir (Howell *et al.*, 2000; Maddox *et al.*, 2000)).  $I_{inf}$  désigne le retour maximum

de fluorescence,  $I(0)$  étant la fluorescence déterminée immédiatement après photoblanchiment et  $k$  la constante de temps. La demi-vie de la fluorescence associée à la structure définie comme le temps nécessaire pour aboutir à  $I(t_{1/2}) = I_{\text{inf}} / 2$  est donnée par  $t_{1/2} = \ln(2)/k$ .

La fluorescence au premier temps de l'expérience (avant photoblanchiment) a été normalisée à 1. L'ensemble des données normalisées a été analysé au moyen du logiciel Origin v.6. Les données expérimentales ont été confrontées au modèle théorique afin de déterminer les paramètres  $I(0)$ ,  $I_{\text{inf}}$  et  $k$ . Tous les KT's dont la corrélation entre la cinétique de retour de fluorescence et le modèle théorique présente un coefficient inférieur à 0,5 ont été rejetés de l'échantillon.



*Discussion  
Perspectives*

## Discussion et perspectives

### I. LIS1 lie la CLIP-170 au complexe dynéine/dynactine :

#### A. Interaction CLIP-170/LIS1 :

Longtemps postulée, l'interaction entre la CLIP-170 et le complexe D/D a toujours été recherchée, sans succès. Les arguments fonctionnels, résumés par le modèle de Rickard et Kreis (voir l'introduction, (Rickard et Kreis, 1996)) avaient été établis sur la base de données de co-localisation entre les deux partenaires potentiels. Nous avons ajouté à cette liste de co-distribution entre la CLIP-170 et le complexe D/D les bouts (+) des MTs, les sites corticaux ainsi que les MTs astériens. Nous mettons en évidence que LIS1, qui apparaissait comme le meilleur candidat pour lier les deux partenaires, se colocalise avec la CLIP-170 et le complexe D/D en chacun de ces points.

La dépendance d'adressage du complexe moteur vis-à-vis de la CLIP-170 aux bouts (+) des MTs (Valetti *et al.*, 1999) est inversée aux KT's mitotique (Dujardin *et al.*, 1998), mais toutes deux dépendent de l'intégrité du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170. Ces données nous ont conforté dans l'idée que les deux motifs "doigt de zinc" qu'elle contient pourraient être responsable de l'interaction. Cette hypothèse est également fondée sur l'implication de tels motifs dans des interactions protéine-protéine entre NCp7 et Vpr du virus HIV-1 (de Rocquigny *et al.*, 1997). Nos données démontrent sans ambiguïté l'implication de la boîte CCHC distale (la plus proche du domaine consensuel) dans une interaction directe avec la protéine LIS1. Ce domaine est requis pour l'adressage de LIS1 et de la p150<sup>Glued</sup> aux bouts (+) des MTs et celui de la CLIP-170 aux KT's.

*LIS1 pouvant interagir avec la p50/dynamitine, la DIC et la DHC (Tai et al., 2002), elle constitue un intermédiaire d'interactions multiples de la CLIP-170 avec le complexe dynéine/dynactine.*

#### B. Conséquences sur la hiérarchie de recrutement :

En accord avec les données précédemment publiées (Valetti *et al.*, 1999), nous avons pu constater l'implication du domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 dans l'adressage de la

p150<sup>Glued</sup> aux bouts (+) des MTs. Nos résultats restreignent le domaine impliqué au second "doigt de zinc".

La microinjection d'anticorps dirigés contre la CLIP-170 ou la réduction de son expression par siRNA démontrent que cette protéine est située en amont des constituants du complexe D/D dans la hiérarchie d'adressage aux bouts (+). Nos données montrent sans ambiguïté que ces procédures expérimentales n'ont pas d'effets sur la localisation d'EB1. Une interaction avait été démontrée entre EB1 et la p150<sup>Glued</sup> (Berrueta *et al.*, 1999). Sans pour autant remettre en cause ces données, nous proposons que l'association EB1/p150<sup>Glued</sup> ne concerne pas le bout (+) des MTs.

*Nous mettons ainsi en évidence l'existence de deux classes de +TIPs, sur la base de l'implication ou non de la CLIP-170 dans leur adressage aux bouts (+).*

Sur la base de nos observations, nous pouvons définir la hiérarchie de recrutement des partenaires aux bouts (+) comme suit. La CLIP-170 s'y associe, et recrute LIS1 qui à son tour recrute les éléments du complexe D/D. Ces données ont été confirmées par l'équipe de Richard Vallee : la surexpression de LIS1 abolit l'adressage du complexe D/D aux bouts (+), sans affecter le recrutement de la CLIP-170, ni d'EB1 (Faulkner *et al.*, 2000). LIS1 est donc bien le lien unissant le complexe moteur à la CLIP-170.

Néanmoins, l'équipe de Kevin Vaughan propose un mode d'adressage alternatif de la p150<sup>Glued</sup> aux bouts (+). Cette sous-unité du complexe dynactine possède son propre domaine de liaison aux MTs. Les auteurs utilisent l'expression d'une chimère DsRed-p150<sup>Glued</sup> afin de localiser la protéine (Vaughan *et al.*, 2002). Ils mettent en évidence une localisation de la chimère sur des bouts (+) de MTs dépourvus de CLIP-170 et d'EB1. Ces données vont à l'encontre de nos résultats, et sont différents des localisations précédemment publiées par ce même auteur (Vaughan *et al.*, 1999). Nous attribuons cette différence à l'expression d'une chimère exogène, qui aboutit à une quantité de protéine augmentée au sein de la cellule. La p150<sup>Glued</sup> est visualisée directement *via* la DsRed, mais les auteurs n'ont pas détecté l'ensemble du contingent protéique (endogène+exogène) par immunofluorescence. Il est à noter que la DsRed présente un délai d'apparition d'au moins 27 heures (Baird *et al.*, 2000), ce qui signifie que la chimère peut être présente au sein de la cellule sans pour autant que le signal DsRed soit visible. Les auteurs sont probablement en situation de surexpression, sans pour autant pouvoir le détecter. Ceci étant, les données obtenues dans ces conditions pourraient signifier qu'il existe une compétition entre la CLIP-170 et la p150<sup>Glued</sup> pour l'interaction aux bouts (+) des MTs.

De tels problèmes expérimentaux pourraient expliquer les résultats que nous avons obtenus en co-exprimant LIS1-DsRed et le pSuper-CLIP-170. Nous constatons une quasi-absence de CLIP-170 en dépit d'un très léger recrutement de LIS1 et p150<sup>Glued</sup> aux bouts (+). Ces deux protéines sont chacune pourvue d'un domaine de liaison aux MTs. L'absence de CLIP-170 pourrait démasquer un site d'interaction sur les MTs, renforçant l'hypothèse d'une compétition entre la CLIP-170 et LIS1/ p150<sup>Glued</sup> pour la liaison aux bouts (+). Il est à noter qu'en absence d'expression exogène de LIS1, nous n'observons aucun recrutement de p150<sup>Glued</sup> sur ces structures, indiquant que l'expression ménagée de la chimère LIS1-DsRed pourrait être responsable, dans ces conditions, du recrutement de la sous-unité du complexe dynactine.

## II. Quelle fonction pour la CLIP-170 en interphase ?

### A. Influencer la dynamique des microtubules en interphase :

La localisation dynamique de la CLIP-170 aux bouts (+) des MTs (Perez *et al.*, 1999; Pierre *et al.*, 1992) laissait penser qu'elle pourrait jouer un rôle dans le contrôle de leur dynamique instable. *In vitro*, l'utilisation d'un fragment amino-terminal de la CLIP-170 capable de se dimériser (H2) promeut la nucléation de nouveaux MTs auxquels elle s'associe (Diamantopoulos *et al.*, 1999). *In vivo*, l'orthologue de la CLIP-170 chez *S. pombe* a été démontré comme agissant en tant que facteur anti-catastrophe (voir l'introduction, (Brunner et Nurse, 2000)). Chez les mammifères, un dominant-négatif de la CLIP-170 a été isolé, correspondant à la protéine dépourvue de ses domaines d'interaction aux MTs. Son expression délocalise la CLIP-170 endogène ainsi que la p150<sup>Glued</sup> des bouts (+), mais laisse intacte la distribution d'EB1, confirmant nos résultats (Komarova *et al.*, 2002). Dans ces conditions, seule la fréquence de sauvetage est affectée et voit sa valeur diminuée. Les auteurs montrent que la co-expression du fragment de CLIP-170 contenant les deux CAP-Gly permet de restituer la fréquence de sauvetage initiale. L'expression du domaine CAP-Gly de la p150<sup>Glued</sup> ne permet qu'une faible augmentation de cette fréquence, soulignant la spécificité de la réponse obtenue avec le fragment de CLIP-170. Ces données indiquent que la "tête" de la CLIP-170 pourrait posséder une activité promotrice de sauvetage. Néanmoins, le mécanisme d'action du dominant-négatif reste à déterminer. L'effet observé par les auteurs pourrait être exagéré : en effet, il a été démontré que la CLIP-170 dépourvue de son domaine carboxy-terminal présente une plus grande affinité pour les MTs que la forme 'pleine longueur' (Scheel *et al.*, 1999). Les résultats obtenus pourraient résulter d'une augmentation du recrutement de

la protéine aux bouts (+), cette construction étant par ailleurs connue pour son effet de stabilisation des MTs lorsqu'elle est surexprimée. L'effet est bien celui de la "tête" de la CLIP-170 mais pourrait ne pas refléter le comportement de la protéine entière.

*Afin d'évaluer la fonction de la CLIP-170 aux bouts (+) des MTs, nous avons établi une lignée LLCPK exprimant de manière stable la eGFP- $\alpha$ -tubuline. Nous comptons inactiver l'expression de la CLIP-170 dans ces cellules au moyen du plasmide pSuper-CLIP-170 et quantifier les quatre paramètres de l'instabilité dynamique des MTs par vidéomicroscopie 3D. Les résultats présentés ici attestent de la spécificité et de l'efficacité des siRNAs, et nous avons par ailleurs pu évaluer la faisabilité du suivi sur cellules vivantes lors d'expériences pilotes. L'approche complémentaire de microinjection d'anticorps (T1A et H1B) est également envisagée.*

## **B. CLIP-170 et trafic intracellulaire :**

La CLIP-170 a été identifiée comme une protéine pouvant lier les endosomes aux MTs *in vitro* (Pierre *et al.*, 1992). A ce jour, cette fonction n'a pu être mise en évidence *in vivo*. Néanmoins, nous disposons à présent d'outils permettant de perturber cette éventuelle fonction en abolissant l'expression de la CLIP-170 par siRNA. Nous avons établi une collaboration avec Franck Perez (Institut Curie, UMR144) afin d'évaluer les conséquences de l'absence de CLIP-170 sur l'endocytose et le trafic intracellulaire.

L'interaction que nous avons révélée entre la CLIP-170 et LIS1 permet de compléter le modèle de Rickard et Kreis (voir la figure 7 de l'article, (Rickard et Kreis, 1996)). Mais quelle est la signification de cette interaction d'un point de vue fonctionnel ? LIS1 a été mise en évidence comme liant trois sous-unités du complexe D/D dont la DHC, porteuse du domaine moteur. LIS1 lie également la protéine supposée faire le lien statique initial entre l'organite et le MT, la CLIP-170. L'équipe de Richard Vallee propose que LIS1 pourrait jouer un rôle de senseur de l'attachement du cargo aux MTs (Tai *et al.*, 2002). Son association avec la CLIP-170 et le domaine moteur du complexe en fait un transducteur potentiel d'un signal d'attachement. La fonction centrale de LIS1 ne semble pas se limiter à la coordination entre l'attachement et le mouvement puisque de la quantité de protéine présente dans la cellule semble dépendre l'efficacité des processus D/D (Smith *et al.*, 2000). LIS1 est donc un régulateur du complexe D/D.

*Compte tenu de l'ensemble de ces données, on peut redéfinir le modèle de fonctionnement de CLIP-170/LIS1/complexe D/D comme suit. La CLIP-170 assure le lien*

statique initial entre le MT et le cargo. Elle recrute LIS1 qui interagit avec le complexe moteur D/D. LIS1 a alors un effet inhibiteur sur le moteur. Le relâchement du lien statique établi par la CLIP-170 est interprétée par LIS1 comme un signal lui autorisant l'activation du moteur moléculaire. Le mouvement rétrograde a lieu.

### **C. Interactions microtubules/cortex en interphase :**

Récemment, l'interaction des orthologues chez *S. cerevisiae* de la CLIP-170 et LIS1 à été mise en évidence (Sheeman *et al.*, 2003). Néanmoins, leur association n'a pu être démontrée que par double hybride. Elle implique l'unique "doigt de zinc" de Bik1p ainsi que la partie carboxy-terminal du domaine en coiled-coil. Non seulement l'interaction Bik1p/Pac1p est conservée entre la levure et l'homme, mais en plus elle implique quasiment les mêmes domaines fonctionnels. Les auteurs mettent en évidence que Dyn1p, l'équivalent de la DHC des mammifères, se localise de manière dynamique à l'extrémité (+) des MTs polymérisants et dépolymérisants. Cette localisation ne dépend pas de l'équivalent de la p150<sup>Glued</sup>, Nip100p, mais requiert Bik1p et Pac1p (Lee *et al.*, 2003; Sheeman *et al.*, 2003). Les auteurs proposent que l'accumulation de Dyn1p aux bouts (+) est le résultat de l'inactivation du moteur à cette extrémité. Ils démontrent que la délétion du gène NIP100 provoque une augmentation de cette accumulation distale, confirmant cette hypothèse. De manière surprenante, la délétion du gène NUM1 provoque le même phénotype. D'après le modèle présenté en introduction, Num1p pourrait être le récepteur de Dyn1p au cortex du bourgeon. Les données obtenues par délétion de NUM1 suggèrent aux auteurs que la protéine correspondante pourrait se comporter comme un activateur du complexe moteur au cortex du bourgeon. Ainsi, Num1p assurerait l'ancrage de Dyn1p au cortex et l'activerait, provoquant une traction sur les MTs cytoplasmiques.

*Chez la levure bourgeonnante, l'interaction Bik1p/Pac1p permet le recrutement de Dyn1p aux bouts (+) des MTs. Leur instabilité dynamique permet aux MTs cytoplasmique de sonder le volume du bourgeon à la recherche d'ancres corticales contenant Num1p. Dyn1p y est déposée et activée par un mécanisme qui pourrait impliqué Num1p. Il en résulte une traction sur le MT cytoplasmique, transmise au SPB dont il est issu : le noyau est tiré vers l'encolure du bourgeon. Comme nous allons le voir, ce mécanisme est assez proche de celui aboutissant à l'orientation du fuseau de division chez le mammifère.*

### III. Quelle fonction pour la CLIP-170 en mitose ?

#### A. Interactions microtubules/cortex en mitose :

Les résultats présentés dans cette thèse établissent pour la première fois une localisation de la CLIP-170 le long des MTs astériens et aux sites corticaux des cellules mitotiques. La protéine y colocalise avec LIS1 (Faulkner *et al.*, 2000) et le complexe D/D (Busson *et al.*, 1998). Les résultats précédemment publiés par le laboratoire ont défini les sites corticaux comme des points d'ancrage des MTs astériens contenant le moteur D/D, supposés pouvoir exercer sur ceux-ci une traction aidant à l'orientation correcte du fuseau de division. Le parallèle avec le guidage du noyau dans le bourgeon de *S. Cerevisiae* est frappant. Néanmoins, contrairement aux données obtenues chez la levure, le complexe D/D a pu être localisé sans ambiguïté aux sites corticaux des cellules de mammifères.

Le rôle de LIS1 aux sites corticaux a été exploré au moyen de la surexpression d'une construction la codant. Dans ces conditions, la localisation de la p150<sup>Glued</sup> aux MTs astériens et sites corticaux est fortement réduite et l'orientation du fuseau de division est perturbée (Faulkner *et al.*, 2000). Nos expériences de microinjection d'anticorps dirigés contre la CLIP-170 ne semblent pas indiquer de délocalisation de la p150<sup>Glued</sup> des sites corticaux. Ces données indiquent que la CLIP-170 est probablement en aval de la dynactine aux sites corticaux (**figure R6**).

L'étude menée au laboratoire et présentée en annexe (Dompierre *et al.*, en préparation) a permis de déterminer la cinétique d'arrivée et de départ des sites corticaux. Le suivi a été réalisé par vidéomicroscopie 3D, 2 couleurs sur cellules MDCK exprimant de manière stable la GFP- $\alpha$ -tubuline, et transfectées transitoirement par LIS1-DsRed. Dans ces conditions, il apparaît que LIS1-DsRed s'accumule progressivement au site cortical contacté par un MT astérien. Pendant tout le temps de l'accumulation, le MT demeure stablement ancré au cortex. La stabilisation pourrait faire intervenir une signalisation locale à destination des +TIPs, à la manière des stabilisations observées au "leading edge" des fibroblastes en cours de migration. L'ancrage pourrait faire intervenir des protéines comme la CLIP-170 qui en s'accumulant aux sites corticaux pourrait favoriser l'ancrage du MT, le phénomène s'entretenant de lui-même. Les MTs astériens vont contacter les sites corticaux. Il s'en suit une traction qui déplace le pôle du fuseau dont ils sont issus vers le cortex. Cette traction peut aller jusqu'à une déformation du pôle, nettement visible par vidéomicroscopie. Les sites corticaux étant

pourvus du complexe moteur D/D et compte tenu des données obtenues chez la levure bourgeonnante, nous pensons qu'ils exerçaient cette traction en permettant le glissement des MTs astériens le long du cortex. La CLIP-170 étant présente aux sites corticaux, on peut imaginer qu'elle participe à la capture des MTs astériens. Comme proposé plus haut, son interaction avec LIS1 permet de renseigner le complexe moteur sur la présence d'un lien statique avec un MT. Le complexe D/D pourrait alors prendre en charge le glissement du MT capturé le long du cortex cellulaire. De telles figures de glissement n'ont néanmoins pas pu être observées. Le départ des sites corticaux se fait après contact par un MT astérien. Le site est comme décroché du cortex, maintenu au bout (+) du MT. Ce dernier se courbe et le résidu de site cortical fusionne avec le pôle du fuseau.

*Si la nature de l'interaction entre MT et sites corticaux reste à définir ("end-on" ou interaction latérale), elle doit impliquer des protéines capables de s'ancrer au cortex tout en assurant la liaison aux MTs. La CLIP-170 est présente aux sites corticaux et pourrait y assurer une fonction dans la capture, l'ancrage des MTs astériens et/ou l'initiation des mouvements conduisant à l'orientation du fuseau de division. Les outils développés au cours de cette thèse et notamment l'utilisation de siRNA permettront d'évaluer la contribution de la CLIP-170 dans ce mécanisme.*

## **B. Fonction aux kinétochores :**

### ***1. Hiérarchie de recrutement aux kinétochores :***

Les résultats obtenus par notre équipe montrent la coïncidence entre le domaine de liaison à LIS1 et celui responsable de l'adressage de la CLIP-170 aux KTs. Le domaine requis est la seconde boîte CCHC, portée par le domaine carboxy-terminal de la protéine. La surexpression de la p50/dynamitine déplace les deux partenaires des KTs : la présence du complexe D/D aux KTs est requise pour l'adressage de la CLIP-170 et de LIS1 à ces structures. La microinjection d'anticorps dirigés contre la CLIP-170 confirme ces résultats puisqu'elle permet de délocaliser cette protéine sans que la localisation de la p150<sup>Glued</sup> soit affectée.

Les données de FRAP obtenues indiquent que LIS1 pourrait servir de récepteur à la CLIP-170 aux KTs : sa demi-vie est difficilement mesurable, faute d'un enregistrement suffisamment long pour pouvoir déterminer avec précision le retour maximum de fluorescence. Néanmoins, la cinétique présentée ici indique que dans les conditions de



l'expérience, LIS1 n'est pratiquement pas remplacée aux KT. Ces expériences ont été réalisées sur cellules traitées au nocodazole afin de limiter le mouvement des KT lors de l'acquisition confocale et d'augmenter la proportion de cellules mitotiques. Aussi, même si cette hypothèse est peu probable, on ne peut exclure que le retour de fluorescence dépende de la présence des MTs. La demi-vie de la CLIP-170 aux KT est très courte en comparaison de celle de LIS1, indiquant qu'elle s'échange rapidement avec la fraction soluble. La signification biologique de cette donnée reste à déterminer. Cependant, la différence de demi-vie flagrante entre les deux protéines permet d'écarter l'hypothèse d'un renouvellement de concert des deux partenaires aux KT : si le complexe LIS1/CLIP-170 était adressé/relargué aux structures, leurs demi-vies serait identiques.

*Les données de FRAP mettent en évidence une différence de comportement de LIS1 et CLIP-170 aux KT. La signification fonctionnelle d'une telle différence reste à définir. L'analyse par vidéomicroscopie 3D permettra de déterminer si cette différence est corrélée à une cinétique différentielle de l'arrivée et du départ de LIS1 et CLIP-170 aux KT.*

L'équipe de Richard Vallee a mis en évidence que la surexpression du domaine aminoterminal de LIS1, est capable de déplacer LIS1 endogène des KT (Tai *et al.*, 2002). Dans ces conditions, la CLIP-170 demeure associée aux KT. Ces résultats vont à l'encontre de nos données sur la hiérarchie d'adressage. Pour expliquer le phénotype observé, on peut postuler l'existence d'un second récepteur pour la CLIP-170 aux KT. Cependant, l'analyse minutieuse des données de FRAP fait apparaître une courbe de retour de fluorescence monophasique, confortant l'hypothèse de la présence d'un seul partenaire de la CLIP-170 aux KT. Les auteurs ont utilisé l'anticorps monoclonal 210 dans leurs expériences de détection de LIS1 endogène. Comme nous l'avons vu, l'analyse des résultats obtenus avec cet anticorps est délicate puisqu'il ne reconnaît qu'une forme probablement phosphorylée de LIS1. Le phénotype obtenu par les auteurs nécessite donc une réévaluation au moyen d'anticorps dirigés contre toutes les formes de la protéine.

## ***2. Quelle fonction aux kinétochores ?***

Le KT peut être considéré comme un cargo ayant à subir un transport rétrograde le long des MTs du fuseau, en direction du pôle. Dans ce mécanisme, la CLIP-170 pourrait faciliter la capture initiale tangentielle entre le KT et un MT issu du pôle. Les données publiées du laboratoire indiquent que le fragment carboxy-terminal de la CLIP-170 se comporte comme un dominant négatif aux KT : la protéine endogène y est remplacée par la

forme tronquée (Dujardin *et al.*, 1998). Les comptages effectués indiquent qu'en l'absence d'une CLIP-170 capable de lier les MTs aux KT, la proportion de cellules en prémétaphase ainsi que l'indice mitotique augmentent. La CLIP-170 semble donc exercer sa fonction en prémétaphase où quatre grands événements ont lieu : l'interaction initiale tangentielle entre le KT et un MT, le mouvement rapide le long de ce MT en direction du pôle, la formation de la fibre K par insertion de MTs dans la plaque kinétochorienne et la congression vers la plaque métaphasique.

Nos données ne permettent pas de conclure sur l'étape affectée par le dominant-négatif. Néanmoins, nous pouvons conclure des expériences de microinjection d'anticorps que la CLIP-170 n'est pas essentielle au déroulement de la mitose. De plus, nous n'avons observé aucun signe d'aneuploïdie dans les cellules microinjectées : en absence de CLIP-170 aux KT, les chromosomes sont capables de congresser.

*Afin de définir la fonction de la CLIP-170 aux KT, nous envisageons le suivi par vidéomicroscopie 3D du mouvement des chromosomes ou des régions centromériques, au sein de cellules microinjectées par l'anticorps dirigé contre la CLIP-170. Par ailleurs, nous avons entrepris la création de lignées HeLa exprimant de manière stable le plasmide pSuper-CLIP-170. Ces lignées, si elles sont viables, nous permettront de suivre le mouvement des chromosomes en absence de CLIP-170.*

Jusqu'à présent, l'acquisition de la mono-orientation par un chromosome a toujours été présentée comme le produit d'un mécanisme de recherche et capture exercée par les MTs du fuseau, à destination du KT. Une fois la connexion établie, le KT se déplace rapidement en direction du pôle où l'insertion de MTs dans la plaque kinétochorienne marque la formation de la fibre K. L'équipe de Tarun Kapoor a mis à jour un nouveau mécanisme d'acquisition de la mono- puis bi-orientation du chromosome prémétaphasique (Khodjakov *et al.*, 2003). Chaque KT va polymériser sa propre fibre K. Son extrémité (+), en position distale par rapport au KT va interagir avec les MTs du fuseau. Par le biais d'un transport rétrograde MT dépendent, la fibre K va être incorporée au fuseau de division, réalisant ainsi la mono-orientation du KT concerné. *In vitro*, un fragment amino-terminal de la CLIP-170 a été démontré comme pouvant promouvoir l'assemblage de nouveaux MTs (Diamantopoulos *et al.*, 1999). Dans cette situation, pourquoi ne pas penser à la CLIP-170 aux KT comme un facteur capable de promouvoir la formation des MTs de sa fibre K ? Les auteurs précisent que ce mécanisme de nucléation de la fibre K est relativement rare. La CLIP-170 pourrait avoir un rôle dans un mécanisme de sauvegarde, assurant la bi-orientation du chromosome mitotique.

# *Annexe*

## Annexe

Cette section rassemble deux articles auxquels j'ai participé au cours de ma thèse.

Pour le premier (**Dompierre *et al.*, en préparation**), j'ai élaboré un outil permettant le suivi en 3D + temps de structures saisies par vidéomicroscopie. Cet outil permet également de quantifier la fluorescence associée aux structures en 3D et d'exporter les données extraites sous forme d'un fichier directement importable dans un logiciel de type tableur.

Pour le second (**Humbert *et al.*, 2002**), j'ai été impliqué dans la partie microscopie 3D et retraitement d'images.

**Spindle movements and positioning are steered by dynein containing  
cortical sites in MDCK cells**

Jim P. Dompierre<sup>1</sup>, Fabrice P. Cordelières<sup>1</sup>, Frédéric M. Coquelle<sup>1</sup>, Orly Reiner<sup>2</sup>, Jean-Baptiste Sibarita<sup>3</sup>, Jan R. De Mey<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institut Curie - Section de Recherche / C.N.R.S. - U.M.R. 146  
Centre Universitaire d'Orsay  
Bâtiment 110  
91405 ORSAY Cedex  
France

<sup>2</sup> Department of Molecular Genetics  
The Weizmann Institute of Science  
76100 Rehovot  
Israel

<sup>3</sup> Institut Curie - Section de Recherche / C.N.R.S. - U.M.R. 144  
26, rue d'Ulm  
75248 Paris Cedex 05  
France

JRDM present address:

École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg / CNRS - UMR 7100  
C.N.R.S.-U.M.R.7100  
Equipe "Microtubules et Morphogenèse"  
Parc d'Innovation, boulevard Sébastien Brant  
BP 10413  
67412 ILLKIRCH CEDEX  
France

\* Corresponding author: Tel: 33 390 24 47 17, FAX: 33 390 24 46 83.  
email: [jan.demey@esbs.u-strasbg.fr](mailto:jan.demey@esbs.u-strasbg.fr)

## Abstract:

Control of mitotic spindle positioning is a key process for correct development and maintenance of tissue integrity, and involves the dynein/dynactin (D/D) complex. Our previous work had shown that in mitotic MDCK cells, cortical D/D cues assemble at the lateral membrane domain and may capture astral MTs to mediate spindle orientation. Evidence for this mechanism, however, was not obtained. We are using fast 2C 4-D imaging on an MDCK clone, stably expressing GFP- $\alpha$ -tubulin and transiently LIS1-DsRed (which associates with D/D), to study the relation between the appearance of the cues and spindle movements. We report here that the spindle progressively aligns with the substrate, while oscillating up and down. Late in prometaphase, one spindle pole region after the other is seen to become stretched and distorted, and to "jump" towards the apposing membrane domain. Invariably, cortical cues had been assembling at the site toward which the spindle moved. Following the jump, the cues disappeared. MT tips labeled by LIS1-DsRed were seen to interact end-on with the cues. We are analyzing whether this interaction affects their dynamic state. MT depolymerization inhibited cue assembly. We also disturbed the MT-dynamics by doses of nocodazole which prolong prometaphase, but do not block entry into anaphase. This perturbs spindle positioning, also during anaphase. Astral MTs were strongly reduced and cues accumulate all over the basolateral cortex or in the cytoplasm. These results demonstrate that these cues mediate rapid spindle movements (jumps) which achieve final spindle positioning, by interacting with astral MTs and suggest the existence of signaling between molecular complexes at MT tips and the cues, which regulate their turnover and topology.

## Results:

Asymmetric division (1-3), directional locomotion (4, 5) and polarized growth (5, 6) are essential activities of lower and higher eukaryotic cells. They require the integration of overall positional information within the cell and this involves establishing cortical positional cues which can interact with microtubules (MTs), and transfer forces to a MT organizing center (7, 8). Symmetric and asymmetric divisions are critical for development and maintaining tissue integrity and provide interesting models to try and unravel molecular mechanisms. They are controlled by coupling positioning and orienting the spindle to cell polarity and the localization of components which will be segregated asymmetrically. In polarized epithelia, during oocyte specification in *Drosophila* and early development in *C. elegans*, cell polarity is established and maintained by the PAR proteins, atypical protein kinase C (aPKC) and the small G protein Cdc42. Spindle positioning is an active process mediated by astral MTs and the MT-dependent motor protein complex dynein/dynactin (D/D) (9-11). The cells of mammalian simple epithelia align their spindle parallel to the substrate at the level of the subapical adherens belt (12). In these cells, cortical D/D accumulating cues interacting with the tips of astral MTs have been observed for the first time (13). The occurrence of visible D/D cues could be typical for polarized epithelial cells, since in non-polarizing rat epithelial cells (14), they were not detected. Rather, dynein was localized along astral MTs. Inhibiting their dynamics with nocodazole or microinjecting anti-dynein antibodies lowered the number of astral MTs, dramatically reduced localization of dynein among these, and inhibited spindle alignment along the long axis of the cell. Invalidating the human lissencephaly protein LIS1 or D/D leads to impairment of spindle functioning and positioning (14), but elucidation of the role of dynein in this context by genetic and other perturbation approaches is difficult, since during mitosis, it mediates a wide variety of interdependent processes. In MDCK and HeLa cells, D/D co-distributes at these cues with LIS1 and CLIP-170, the founding member of the +Tip family of proteins. LIS1 interacts with subunits of both dynein and dynactin and with CLIP-170 (15) (16), and is thought to adapt the motor complex to polymerizing MT +ends. This large complex may be part of the molecular circuit which tethers MTs to the cues (15). In the budding yeast, a related process consists of the pulling of the elongating post-anaphase nucleus through the mother-bud neck *via* dynein-dependent sliding of cytoplasmic microtubules along the cortex of the bud, and Pac1, the yeast homologue of LIS1, plays a key role in this process (17-19).

The present study addresses the questions whether astral MT interactions with D/D cortical cues really mediate the positioning of the spindle in mammalian epithelial cells and by which mechanism the complex accumulates at the cell cortex. We examined in polarized MDCK cells the pathway of spindle positioning, the kinetics of LIS1 accumulation at cues, the mode of MT-cue interaction, and the role of astral microtubules in the process. Spindle movements in such cells were expected to be complex and multidimensional (12). We have been using fast 3D time-lapse imaging (4 D) with high-throughput deconvolution (20, 21), adapted so as to enable rapid recording of two differently fluorescence-tagged proteins (see supplemental web material). Briefly, the image stacks are recorded under control of the CCD captor, operated at frame rate in the overlapped mode but, upon acquisition of every image, it now triggers a rapid wavelength change within a Sutter DG4 illuminator, and every second image, also a Z-step by the Piezo driver. Their rapid response and the frame rate overlapped mode assure that >90% of the acquisition process is concerned with exposures. Carrington and coll. have developed the first ultra rapid 4D video system and stressed the need for a 20 ms wait time between each Z-stepping to relax from vibrations (22). The overlapped mode of operation, however, leaves almost no pauses. Major concerns were that the volume sampled may not remain immobile and that rapid wavelength switching could render the illumination flux unstable. Correct functioning was assessed by a simple test (Fig. 1A and B), which could serve to test any multidimensional recording device. Our system does not apply wavelength filtering at the emission side, avoiding moving parts and additional loss of photons. A mixture of FITC and Rhodamin fluorescent beads recorded to yield similar grey levels revealed a 4% leakage from the red into the green, and none from the green to the red. This is problematic only when the level of red fluorescence largely exceeds the green one, e.g. when heavily overexpressed, but that was not the case in the work presented here. Overall, these results and those below demonstrate the capability of the frame-rate overlapped acquisition mode for rapid acquisition of 2 colour 4-D (2C 4-D) data.

An MDCK clone stably expressing GFP-tagged  $\alpha$ -tubulin at low levels (11% of endogenous tubulin, not shown), was established. It exhibits normal growth and progresses at normal rates through cell division. A DsRed-tagged form of LIS1 (15) co-localized with dynactin at all the sites previously described (Fig. 2A) and since it physically interacts with the D/D complex and CLIP-170, we decided to test it as a marker for the complex. We were concerned by a report showing that overexpression of LIS1 perturbs spindle assembly and positioning and displaces CLIP-170 from the kinetochores of nocodazole treated HeLa cells (16). We



observed the latter effect only in nocodazole treated cells (not shown). In MDCK cells transiently expressing this LIS1 form, all the cells completed mitosis and cytokinesis normally (mean duration of prometaphase: 34 +/- 9 min, n=14). In addition, CLIP-170 association with kinetochores was normal (supplemented material, Fig. 1.). We concluded that DsRed-tagged LIS1 was a reliable marker for the motor complex. Rapid 4D imaging of mitotic cells had not been performed before, and the possibility that it would induce unwanted side effects was assessed. We first did a series of recordings using MDCK cells expressing GFP-tagged  $\alpha$ -tubulin alone, and grown to confluency on glass coverslips. The cells completed normally mitosis (mean duration of prometaphase: 38 +/- 7 min, n=44) when the interval between acquiring stacks was 20 seconds. Shorter intervals (3 sec) are tolerated over a period of 5-10 minutes. In agreement with a study in LLCPK1-cells, we observed the formation of numerous MT foci near the fading nuclear envelope at the onset of prometaphase (Fig. 2 B and C). These foci migrated rapidly towards the centrosomes (movie 1, suppl. material) and this contributed to rapidly setting up a bipolar spindle. We have 3D tracked each spindle pole (Fig. 1C), and plotted the angles between the spindle axis and the substrate against time (Fig. 3B). Using this tool insights were obtained on the pathway of spindle positioning in a population of 44 cells. Spindle positioning was accomplished along many pathways. In a majority of the cells, the spindle became rapidly aligned with the substrate. In the other cells (Fig. 3 A and B; movie 3, suppl. material), it first assembled to a variable extent aligned along the apical-basal cell axis. It then re-aligned parallel with the substrate, after having been oscillating up and down. The spindle axis also rotated within the plane of the culture up to late in metaphase. Spindle movements were mostly smooth and progressive. In late prometaphase, however, spindle pole regions became stretched and distorted a few times, indicating that they underwent pulling forces. Poles showing this behavior subsequently « jumped » towards the apposing cell cortex, displacing the entire spindle. In a few cells, expressing somewhat more tagged tubulin, (Fig. 2 D, and movie 4, suppl. material), individual astral MTs were seen. Corroborating observations on fixed cells (12), one of the centrosomes had left the apical cell border first during prophase, and it was initially more active in astral MT nucleation than the second pole. Stereo viewing showed that most astral MTs were initially oriented towards the basal side of the cell (23). In the cell shown here, this pole also exhibited the first events of pulling and « jumping », but analysis of all the cells did not allow for distilling a clear pattern. After NEB, almost all astral MTs were visible only in one time frame, in agreement with their very short live-time (< 30 sec) (24). Interestingly, a small number of MTs became tethered through their +end to the cortex and paused during up to three minutes. They eventually

detached, displaying various degrees of curvature (movie 5, suppl. material), indicating that they had been under tension (24). Later in prometaphase, the second pole started to nucleate more MTs. One of these was also seen tethering to a region of the cortex (Fig. 3 F, arrow, movie 5, suppl. material) and this was followed by a sudden movement of the spindle pole. These first results demonstrate that rapid 4D recording of spindle orientation is feasible and serve as control for the subsequent experiments using DsRed-tagged LIS1. They reveal that the cell cortex can capture astral MTs and stabilize them, and that a few such interactions can mediate sudden directed spindle movements.

2C 4-D recording was performed using the GFP-tagged  $\alpha$ -tubulin expressing MDCK clone, in which DsRed-tagged LIS-1 was transiently expressed. DsRed-tagged LIS1 first associated with the nuclear envelope (Fig 2 B and C). It also appeared at the center of the MT foci appearing during nuclear envelope breakdown (Fig. 2 B) and migrated with them towards the poles (Fig. 2 C, and movie 2 suppl. material). This observation supports the conclusion by Rusan and colleagues that the foci migrated in a dynein-dependent fashion (25). D/D could also play a role in the organisation of MTs nucleated near the envelope under the control of RAN-GTP as foci, according to a mechanism demonstrated in frog egg extracts. DsRed-tagged LIS1 also very rapidly accumulated at kinetochores, during nuclear envelope breakdown. It dissociated from them, as they attached to spindle fibers, and migrated along these towards the spindle pole. The combined migration of LIS1 from the kinetochores and the MT foci resulted in its transient accumulation near the poles. The cells exhibited the same type of spindle movements and “jumps” found in non-LIS1 expressing cells, further supporting that DsRed-tagged LIS-1 is not inducing a phenotype. LIS1-containing cortical cues were seen to appear at exactly the same basolateral localizations as described before in fixed cells (Fig. 3 C). This is particularly evident in animations of side view maximal intensity projections (xzMIPs) (movie 6, suppl. material). More cues subsequently accumulated exactly at the membrane region toward which a spindle pole subsequently « jumped ». This region coincided with the lateral domain underneath the tight junctions. Interestingly, during building up of LIS1-containing cues at one cell border, it gradually disappeared from the apposing polar region. In addition, immediately following the jump, the cues disappeared from the cortex in a coordinated fashion. In the cell presented here (Fig. 3C, bottom part), just preceding anaphase, cues assembled at the cell border facing the second pole, before it migrated towards them. LIS1 was again seen to disappear from the pole as cues appeared at the cell border. In a few cells, some MT +ends were seen tethering to the cell cortex and

become stabilized for up to three minutes (Fig. 4 B). Interestingly, a MT was captured before LIS1 was detectable at the cue and it progressively accumulated near the tip of the captured MT (Fig. 4 B and E). The MT eventually retracted, leaving behind a cue loaded with LIS1 (movie 7, suppl. material). Surprisingly, cues were seen to move along the cell cortex (at speeds of 2  $\mu\text{m}/\text{min}$ ), to fuse among them (Fig. 4 C and F, and movie 8 suppl. material), and to capture new MTs. Cues were also seen to detach from the cortex while attached to the +end of a MT (Fig. 4 D and movie 9, suppl. material). We concluded that the recruitment and turnover of LIS1 at cues is likely under direct control of astral MTs. In order to further assess this, we have used the microtubule inhibitor nocodazole (Fig. 4 A). In cells treated with high concentrations (33  $\mu\text{M}$ ), LIS1 cues did not appear at the cortex. In cells treated with a concentration known to suppress MT dynamics (25 nM), however, the cues were larger and enriched in LIS1. In near-metaphase cells, often only one pole was found to have astral MTs and these were tethered to large and intensely stained LIS1 containing cues. In living cells, such cues were found to exhibit longer than normal life times. The appearance of LIS1 at cues was also dependent on intact dynactin, since overexpression of dynamitin was inhibiting it (not shown). In these cells, spindle orientation was heavily perturbed. The cells underwent cleavage with some delay, but failed to align their spindle with the substrate (not shown).

## Discussion:

We have introduced here a novel imaging system performing rapid 2C 4D widefield deconvolution imaging. Recording many more images than usual, the cells progressed through cell division normally under the experimental conditions. This was not anticipated, since mitosis is a stress sensitive process, and indicates that this imaging strategy will be applicable to other studies exploring a wide range of cellular processes and for dissecting gene product functioning. Our results reveal a spatial and temporal correlation of events which strongly supports the notion that cues, capturing and stabilizing +ends of astral MTs and recruiting the CLIP-170/LIS1/D/D complex, steer these “jumps”. They also provide evidence for a direct role for astral MTs in depositing the motor complex at cues and in their removal from the cortex. The occurrence of “jumps”, often preceded by spindle deformations strongly indicate that these are mediated by forces generated by D/D motor activity. Available data indicate that LIS1 is an activator of the dynein motor activity (26) and an adaptor of the motor complex to MT +tips, *via* its interaction with CLIP-170 (15). The dynamics of LIS1 uncovered in our study could therefore reflect those of a large D/D containing motor complex. It is also possible, however, that at the cues, the arrival of some of the protein subunits is slightly advanced or delayed. Dynactin, being most likely positioned closer to the cell border, could have been localized at the cues at the moment of capture. 2C 4D imaging with appropriate couples of differently-tagged subunits will be necessary to resolve this question. This will, however, be technically demanding. Exogenously expressed dynamitin and Arp1 readily induce phenotypes and it will be necessary to work with very low levels of fluorescence-tagged forms. With these restrictions in mind, we were excited to find that LIS1 is deposited at the cues by means of captured and paused astral MTs. Indeed in the absence of MTs, no LIS1 is recruited, and slowing down astral MT dynamics leads to more LIS1 accumulating at cues. Dynactin and CLIP-170 reacted identically to these uses of nocodazole as seen by indirect immunofluorescence (not shown). This makes it more likely that we have been monitoring the complete D/D complex, and that other proteins incorporated within the cues in a MT-independent fashion, mediate the initial capturing. Our data lead us to speculate on the pathway by which LIS1 is deposited at cues. CLIP-170/LIS1/D/D, present on the +ends of elongating astral MTs, could simply be downloaded at the site of contact. But if this were the case, how can one explain the increase in its amount at that site? We rather envision recruitment from a cytoplasmic pool or active transport of an inactive form towards the +ends

as possibilities. Normally, the complex should disappear from the MT-tip when it stops elongating, but LIS1 remained associated with cues after detachment of the astral MT, and cues remained attached to MT-ends upon their detachment from the cortex. This indicates that the complex is stabilized in association with other molecules which tether the MT tip. This behaviour is reminiscent of that described for *tea1p* in the fission yeast *S. pombe* (27). This protein is a cell end marker playing a crucial role in generating linear polarized growth (28). It is transported on plus ends of elongating MTs from the vicinity of the nucleus to the cell ends. Any perturbation which leads to a defect in MT elongation, leads to the absence of *tea1p* from cell ends. Upon reaching the cell end, it is transferred from the tip of paused MTs to the cortex of the cell. Here, it is required for retention of other polarity markers, among which figures the CLIP-170-like protein *tip1p*. *Tea1p* is also left behind at the cortex after the MT starts shrinking, and sometimes detaches from the cortex while remaining attached to the shrinking MT end. It has been proposed that *tea1p* may be required for the MT plus ends to recognize the place to pause MT growth, thereby contributing to the overall organization of the microtubular cytoskeleton. Our findings are the first of that kind in mitotic cells of higher eukaryotes, and point to a highly conserved mechanism by which regulatory proteins accumulating at the tips of polymerizing MTs assist in the search and capture mechanism which helps integrate the cellular space. It will be challenging to try and identify all the proteins acting in this pathway. LIS1 containing cues initially appear dispersed at the basolateral side of the cell, but eventually are enriched in the *zonula adherens*, just below the tight junctions. We also found that they are motile, and fuse among each other. More work is needed to see whether this is the main pathway by which they acquire their final polarized topology. Very little is known about the signals which control this dynamic cue positioning. Previously, we had shown that their formation is dependent on F-actin containing microfilaments (13). This suggested that a control is exerted *via* local signalling to the submembranous actin network. In some cells, a positive correlation between appearance of cues and MT nucleation from a nearby centrosome could be inferred, but more work is needed to assess its significance. Such a mechanism is plausible since in the early one cell stage embryo of the round worm *C. elegans*, polarization of the anterior-posterior (A/P) axis is a MT-directed process (29, 30). The PAR proteins are involved in spindle positioning and force generation (31). Asymmetric PAR2 was first detected on the cortex nearest to the emerging spermatid (29, 30). The domain occupied by PAR2 expanded in relation to the developing spermatid, excluding PAR3 to the anterior. It has thus been proposed that astral MTs, or factors associated with them, promote the binding of PAR2 to the cortex. It will be

interesting to explore whether this involves mechanisms similar to the ones shown for tealp and LIS1. In conclusion, our results add new evidences in support of the emerging principle that conserved regulatory complexes, localized at MT plus ends and at special sites or regions of the cellular cortex, collaborate to integrate spatial organization of cells. The details, however, may differ to a certain extent. For example, the D/D dependent mechanism for anaphase nuclear migration into the yeast involves a sliding of D/D loaded MTs along Num1p-containing cortical cues (reviewed in (1)). We did not see such a gliding. The final stages of spindle positioning in epithelial cells apparently use a different mechanism that may have evolved in multicellular organisms.

## Acknowledgments:

We gratefully acknowledge the important contributions of Universal Imaging, Roper Scientific France, Leica and LIS (Beat Ludin) for advise and help with building the system, and the enthusiastic support by D. Louvard. We thank Neda Zahedi for helpfull discussions on 3D image analysis. J.P. Dompierre and F.M. Coquelle were supported by a grant from l'Association pour la Recherche sur le Cancer. F.P. Cordelières was supported by a grant from la Ligue Nationale contre le Cancer.

## Bibliography:

1. K. Bloom, *Curr Biol* **11**, R326-R329. (2001).
2. J. A. Knoblich, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 11-20. (2001).
3. C. Q. Doe, B. Bowerman, *Curr Opin Cell Biol* **13**, 68-75 (Feb, 2001).
4. G. G. Gundersen, *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 296-304 (Apr, 2002).
5. D. Brunner, *Dev Cell* **3**, 2-4 (Jul, 2002).
6. A. Gupta, L. H. Tsai, A. Wynshaw-Boris, *Nat Rev Genet* **3**, 342-355 (May, 2002).
7. B. L. Goode, D. G. Drubin, G. Barnes, *Curr Opin Cell Biol* **12**, 63-71 (2000).
8. D. Pruyne, A. Bretscher, *J Cell Sci* **113 ( Pt 3)**, 365-375 (Feb, 2000).
9. A. A. Hyman, *J Cell Biol* **109**, 1185-1193 (Sep, 1989).
10. A. R. Skop, J. G. White, *Curr Biol* **8**, 1110-1116 (Oct 8, 1998).
11. P. Gonczy, S. Pichler, M. Kirkham, A. A. Hyman, *J Cell Biol* **147**, 135-150 (1999).
12. S. Reinsch, E. Karsenti, *J Cell Biol* **126**, 1509-1526 (Sep, 1994).
13. S. Busson, D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre, J. R. De Mey, *Current biology* **8**, 541-544 (1998).
14. N. E. Faulkner *et al.*, *Nat Cell Biol* **2**, 784-791. (2000).
15. F. M. Coquelle *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3089-3102 (May 1, 2002, 2002).
16. C.-Y. Tai, D. L. Dujardin, N. E. Faulkner, R. B. Vallee, *J. Cell Biol.* **156**, 959-968 (March 18, 2002, 2002).
17. N. R. Adames, J. A. Cooper, *J Cell Biol* **149**, 863-874 (May 15, 2000).
18. W.-L. Lee, J. R. Oberle, J. A. Cooper, *J. Cell Biol.* **160**, 355-364 (February 3, 2003, 2003).
19. B. Sheeman *et al.*, *Curr Biol* **13**, 364-72 (Mar 4, 2003).
20. T. M. Savino, J. Gebrane-Younes, J. De Mey, J.-B. Sibarita, D. Hernandez-Verdun, *J. Cell Biol.* **153**, 1097-1110 (May 29, 2001, 2001).
21. J. B. Sibarita, H. Magnin, J. R. De Mey, *Proc. 2002 IEEE Intern. Symp. Biomed. Imaging, publ. by IEEE*, 669-772 (2002).
22. W. A. Carrington *et al.*, *Science* **268**, 1483-1487 (Jun 9, 1995).
23. N. Schultz, A. Onfelt, *Cell Motil Cytoskeleton* **50**, 69-88 (Oct, 2001).
24. N. M. Rusan, C. J. Fagerstrom, A. M. Yvon, P. Wadsworth, *Mol Biol Cell* **12**, 971-980. (2001).
25. N. M. Rusan, U. S. Tulu, C. Fagerstrom, P. Wadsworth, *J. Cell Biol.* **158**, 997-1003 (September 16, 2002, 2002).
26. D. S. Smith *et al.*, *Nat Cell Biol* **2**, 767-775 (2000).
27. R. Behrens, P. Nurse, *J Cell Biol* **157**, 783-793 (May 27, 2002).
28. J. Mata, P. Nurse, *Cell* **89**, 939-49 (Jun 13, 1997).
29. M. R. Wallenfang, G. Seydoux, *Nature* **408**, 89-92 (Nov 2, 2000).
30. A. A. Cuenca, A. Schetter, D. Aceto, K. Kemphues, G. Seydoux, *Development* **130**, 1255-65 (Apr, 2003).
31. S. W. Grill, P. Gonczy, E. H. Stelzer, A. A. Hyman, *Nature* **409**, 630-3 (Feb 1, 2001).



## Materials and Methods :

### **Cell culture and Transfection:**

MDCK II cells were grown in MEM supplemented with L-Glutamin, penicillin/streptomycin, and 7 % FCS (all reagent from InVitrogen) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For videomicroscopy and immunolocalization experiments, 4x10<sup>6</sup> cells were seeded on 18 mm diameter glass coverslips and further grown for 2 days. When indicated, cells were transfected using Exgen 500 (Euromedex) with a construct encoding for Lis1-DsRed expressed for 36 to 48 hours. To analyse cells entering mitosis under influence of nocodazole (25nm or 33µM) cells were synchronized using aphidicolin prior to drug treatment. A stable MDCK II cell line generation (A4C2) expressing eGFP- $\alpha$ -tubulin (Clontech, Palo alto, CA) was generated under selection of 1mg/ml geneticin, isolated by the cloning rings technique.

### **Immunoblotting:**

Cell extracts from parental and A4C2 cells were obtained by lysis in appropriate buffer (50mM Tris-HCl pH7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40) supplemented with antiproteases (Complete®, EDTA Free, Roche). Cell lysate was clarified (14000 rpm, 15 min) and supernatant boiled in SDS sample buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membrane using mini-blot electrophoretic cell according to the manufacturer's instructions (Biorad). Membrane was further processed as described in (Coquelle et al., 2002).  $\alpha$ -tubulin (clone DM1a, Sigma) or eGFP (Clontech) were detected after incubation of membrane with SuperSignal West Pico® (Pierce), revealing the HRP-conjugated antibody (Jackson Inc.). Quantifications were performed using GeneGnome (Syngene).

### **Immunocytochemistry and antibodies:**

For the colocalization experiment, cells were lysed for 2 min in 0.5% Triton X-100 and fixed in 3% paraformaldehyde in PHEM buffer (18). They were washed three times for 5 min each in PBS and further permeabilized for 25 min in 0.1% Triton X-100 in PBS. The cells were treated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS for 10 min, washed three times for 5 min each in PBS, blocked in PBS-BSA (PBS containing 0.1% BSA), and labelled with appropriate antibodies for 1 h at 37°C. After being washed in PBS-BSA, the cells were incubated with secondary antibodies for 45 min. The cells were postfixed in 4% formaldehyde in PBS for 16 min and

treated with 50 mM NH<sub>4</sub>Cl in PBS for 10 min. The chromosomes were stained with DAPI (Sigma) for 5 min. Coverslips were mounted using PBS–50% glycerol containing 100 mg/ml of antifading agent 1.4-diazabicyclo-(2.2.2) octane (DABCO, Sigma). All antibodies were diluted in PBS-BSA.

Antibodies were monoclonal anti-p150<sup>GLUED</sup> (Transduction Laboratories), affinity purified polyclonal anti-LIS1 (Sapir et al.1997), human CREST autoimmune anti-serum recognizing the centromeric region of chromosomes (gift from Dr. H. Ponstingl, German Cancer Research Center, Heidelberg, FRG), monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (DM1A, Sigma). All secondary antibodies were made in goat and conjugated to Cy3, or Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, Pa.) or ALEXA-488, -594, -350 (Molecular Probes).

### **Three-dimensional coordinate geometry:**

In order to extract the three-dimensional coordinates of the pole, the structure was tracked 5 times on two orthogonal MIPs (xy MIP and xz MIP) using the ‘track point’ tool of the Metamorph software. The mean value of the 5 records was used to calculate the three following parameters.

The distance between poles was calculated using three-dimensional coordinate geometry:

$$\text{distance} = \sqrt{(x_{B1} - x_{A1})^2 + (y_{B1} - y_{A1})^2 + (z_{B1} - z_{A1})^2}$$

The angle between the spindle poles axis and horizontal plane was obtained by:

$$\text{angle} = \arctan\left(\frac{z_{B1} - z_{A1}}{x_{B1} - x_{A1}}\right)$$

The velocity was calculated using coordinates collected over time as follows:

$$\text{velocity} = \frac{\sqrt{(x_{A2} - x_{A1})^2 + (y_{A2} - y_{A1})^2 + (z_{A2} - z_{A1})^2}}{t_2 - t_1}$$

The data were imported into an Excell spreadsheet for further analysis and plotting.

### **3D+t quantifications:**

MetaMorph software was used to track the cortical cues using the ‘track point’ tool on xy MIPs of the acquired 3D+t serie. A journal was created to record x, y coordinate as well as the intensity of the point. This intensity was used to recover the missing z coordinate from the corresponding stack. An extension module of Metamorph software was programmed to place a 5x5x3 pixels box around the (x,y,z) point. The barycentre (centre of mass defined using intensities of voxels as weight) was determined and its 3D coordinates recorded (x<sub>b</sub>, y<sub>b</sub>, z<sub>b</sub>). A 5x5x3 pixels box (i.e. 75 voxels) was placed around the (x<sub>b</sub>, y<sub>b</sub>, z<sub>b</sub>) point, and the intensity

integrated ( $I_S$ ) in this volume. A second box, larger than the previous one, was centred on the barycentre (7x7x5 pixels box, i.e. 245 voxels) in order to quantify the local background. Its integrated intensity was logged ( $I_B$ ). Finally, the whole intensity of the stack was recorded ( $I_{ttl}$ ). This allowed to correct  $I_S$  and  $I_B$  for photobleaching occurring during acquisition by calculating the ratios  $I_S/I_{ttl}$  and  $I_B/I_{ttl}$ , respectively. The cortical cues intensity bleach and background corrected ( $I_C$ ) was calculated as follows:

$$I_C = \frac{I_S}{I_{ttl}} - \left( \frac{I_B}{I_{ttl}} - \frac{I_S}{I_{ttl}} \times \frac{(245 - 75)}{75} \right)$$

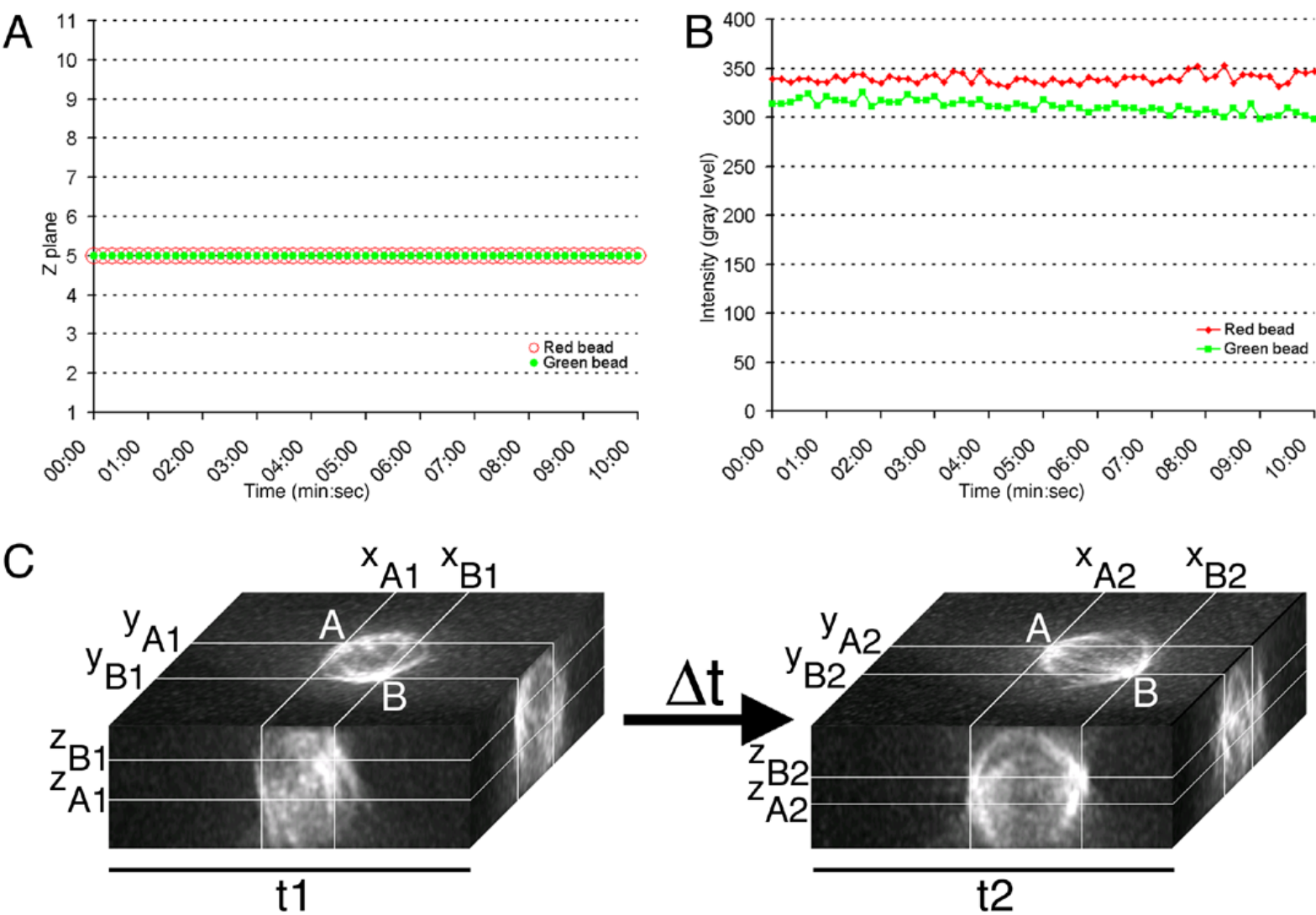
The first time point  $I_C$  was set to 1 and following values normalized subsequently. The data were imported into an Excell spreadsheet for further analysis and plotting.

Legends:

**Figure 1 : *Beads do not move during 4 and 5D acquisitions; Spindle pole tracking.***

A mixed population of green and red 175 nm fluorescent beads were attached to a polylysine-coated cover-slip, mounted in the observation chamber with cell growth medium, and recorded in the 2C 4-D mode. 60 stacks each consisting of 34 images (2 x 17) taken at 50 msec exposure times were recorded at 10 sec intervals. Using Metamorph, the centre of individual green and red beads extracted from the same stack was detected automatically and their x, y and z coordinate determined in each of the stacks. In three series of acquisitions, the x, y (not shown) and z values (A) never changed, and the maximum intensity of the beads (B) remained stable within 10%. Panels A and B shows a representative red and green bead. This demonstrates that the Piezo positioner, observation chamber and microscope incubator form a solid assembly which is compatible with fast 2C 4-D imaging. (C) In order to extract the three-dimensional coordinates of the pole, the structure was tracked 5 times on two orthogonal maximal intensity projections (xy MIP and xz MIP) using the 'track point' tool of the Metamorph software. The mean values were used to calculate the distance between poles, the angle between the spindle axis and horizontal plane and their velocity.

Figure 1



## **Figure 2 :**

### ***(A)-LIS1-DsRed co-localizes with dynactin in mitotic MDCK cells.***

MDCK cells were transfected by LIS1-DsRed construct. Cells were fixed 36 hours after transfection and stained by a monoclonal antibody raised against p150<sup>Glued</sup>. LIS1-DsRed (Red) co-distributes with p150<sup>Glued</sup> (Green) at the spindle poles, at cortical sites and along astral microtubules.

### ***(B-E)-Spindle poles formation and behaviour from prophase to metaphase.***

#### ***(B)-2C-3D-time laps recording of LIS1-DsRed expressing A4C2 cell.***

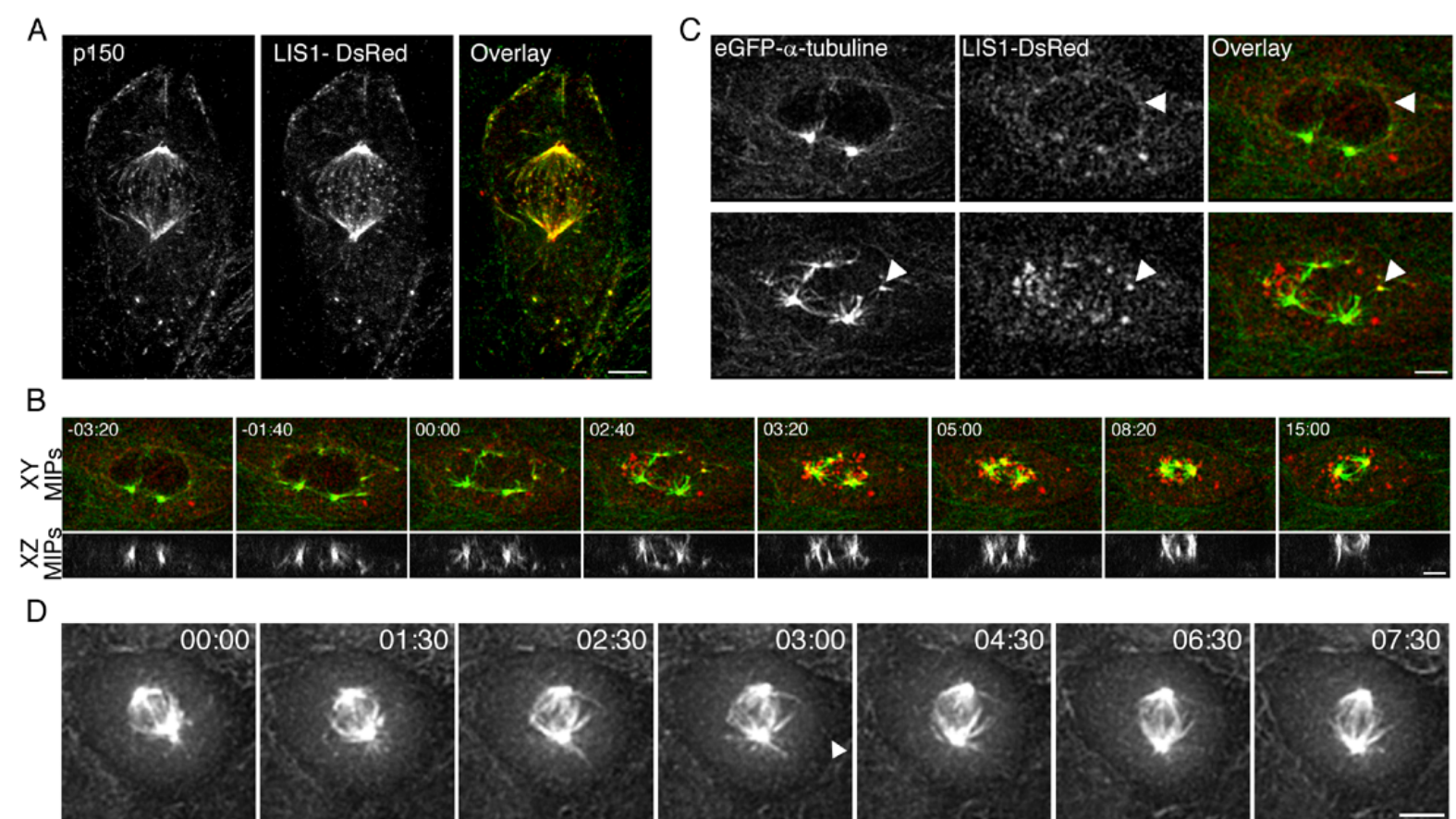
Shortly before NEB, non-centrosomal MTs form LIS1-DsRed containing foci around nuclear envelope, at the bottom of the cell (xz MIPs). The foci progressively slide along the spindle/astral MTs to finally merge with the spindle poles. Top view: xy MIPs, LIS1-DsRed (Red) and eGFP- $\alpha$ -tubulin (Green) overlay; Side view: xz MIPs, eGFP- $\alpha$ -tubulin only. Acquisition frequency: one stack/30 sec.

(C)- Detailed insets from Fig. 2B showing LIS1-DsRed at the nuclear envelope in prophase cell (arrowhead, top row, time point -05:00) and at centre of MT foci in early prometaphase cell (arrowhead, bottom row, time point 02:30).

#### ***(D & E)- 3D-time lapse recording of spindle orientation in early prometaphase A4C2 cells.***

Images shown are maximum intensity projections of 34 planes deconvolved stacks, collected at 20-s intervals, seen in top (XY MIPs) and side (XZ MIPs) views (signal: eGFP- $\alpha$ -tubulin). An astral microtubule tethered to the cortex (arrow) drive the spindle pole movement toward the cortical attachment. Bars, 5 $\mu$ m.

Figure 2



**Figure 3 : Time course of spindle positioning: the role of LIS1 containing cortical sites .**

(A-B)- 3D-time lapse recording of spindle orientation in A4C2 cells.

Images shown are maximum intensity projections of 34 planes deconvolved stacks, collected at 20-s intervals, seen in top (XY MIPs) and side (XZ MIPs) views (signal: eGFP- $\alpha$ -tubulin). At NEB, the spindle axis is perpendicular to the horizontal plane (A, times 00:07:00 to 00:12:00). The spindle then undergoes a series of oscillations resulting in its orientation parallel to the substrate (B, time 00:12:00 to 01:45:00). This orientation is likely due to tensions applied from the cortex toward the poles, since deformations of the spindle can be observed (see A, time 00:48:00, arrow). At the anaphase onset, the spindle pole axis is parallel to the substrate, and no more oscillations can be seen.

(C-F)- LIS1 containing cortical sites steer spindle orientation in MDCK cells.

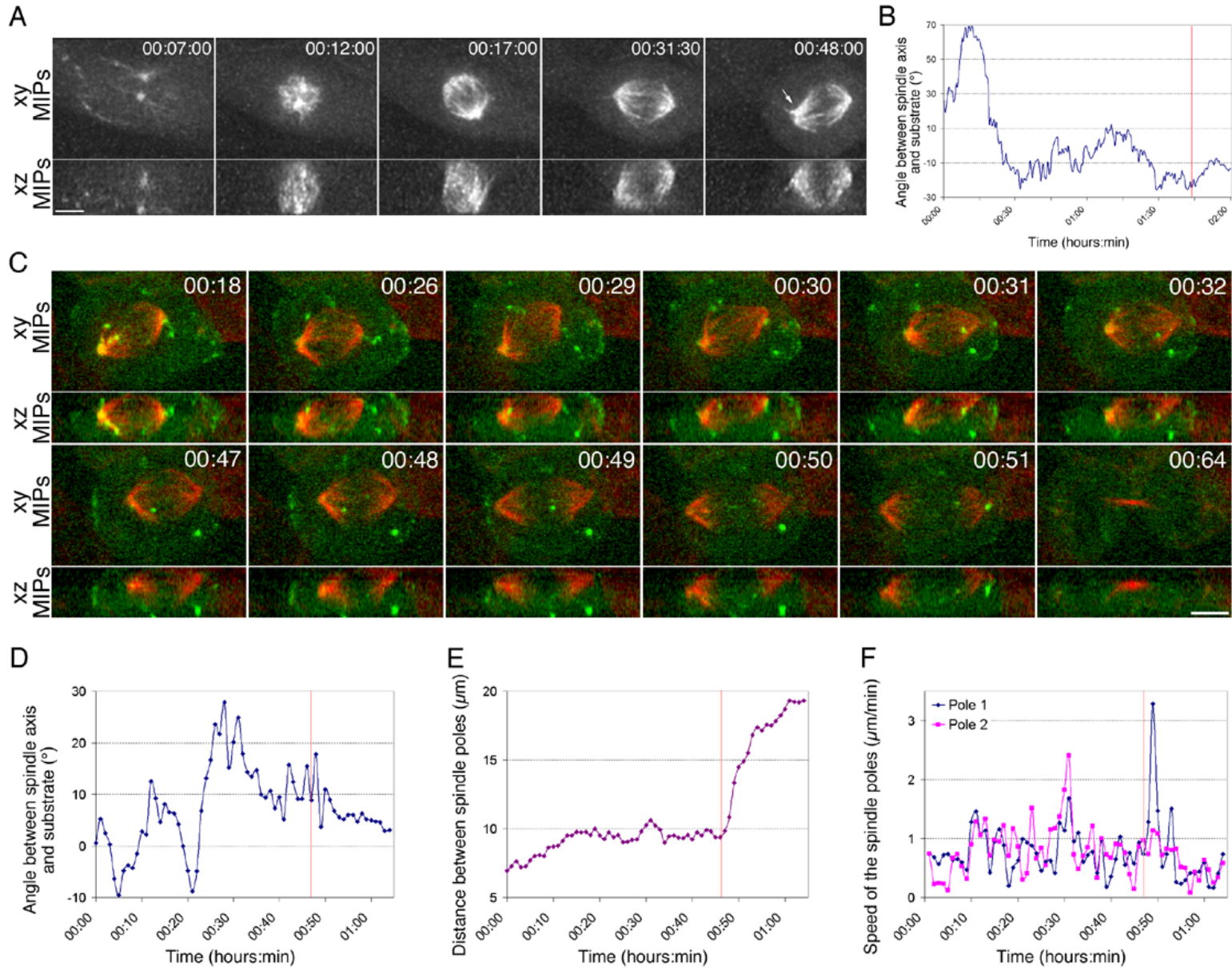
(C)- 2 colours-3D-time lapse recording of A4C2 cell transiently expressing LIS1-DsRed. Images shown are merged and colorized maximum intensity projections of 34 planes deconvolved stacks of each colour, collected at 1 min intervals. eGFP- $\alpha$ -tubulin is in red, LIS1-DsRed is in green.

From prometaphase on, LIS1 containing cortical sites accumulate at the cell cortex in front of spindle poles (C, time 00:18 to 00:26, right). The pole facing the cortical sites is then steered, resulting into a sudden jump of the spindle toward the cortex (F, time 00:30 to 00:40). As the pole contacts its cortical anchor, LIS1 signal fade away. During all steps of the movement, the angle between spindle axis and the substrate oscillates (D) and progressively tends to its anaphase value, close to  $0^\circ$  (D to F). In anaphase, only the pole facing the cortical sites moves toward them (C, time 00:47 to 00:50, left), while the other pole remain anchored close to the cortex. From anaphase on, the interpolar distance increases (E, from time 00:50) while the spindle axis remains horizontal.

Red lines indicate anaphase onset. Bar, 5 $\mu$ m.



Figure 3



**Figure 4 .: *Influence of microtubule dynamics on the behaviour of the cortical sites.***

(A)- *Distribution of dynactin and microtubules in control and nocodazole treated cells (33  $\mu\text{M}$  and 25 nM).* Cells were aphidicolin synchronized (2 mM) for 20h and treated for 3h with nocodazole from G2 phase on, so that all the cells enter mitosis under the influence of the drug. Cells were then fixed and stained for  $\alpha$ -tubulin (left column) and Arp1 (middle column). Stacks of optical sections were deconvolved and reconstructed into maximum intensity projections. In the absence of microtubules (nocodazole 33  $\mu\text{M}$ ), dynactin localizes at the kinetochores but is absent from the cell cortex (middle line, centre). The distribution of dynactin also appeared disorganized under a 25 nM of nocodazole treatment, and accumulates as large aggregates at the cell cortex and in the cytoplasm, where the astral microtubules remain (bottom line, centre). Bar, 5 $\mu\text{m}$ .

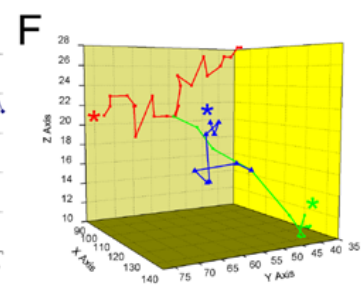
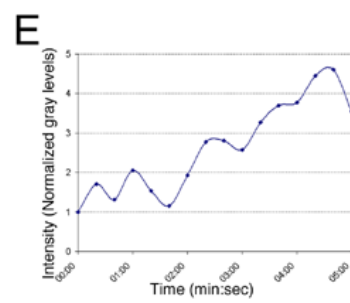
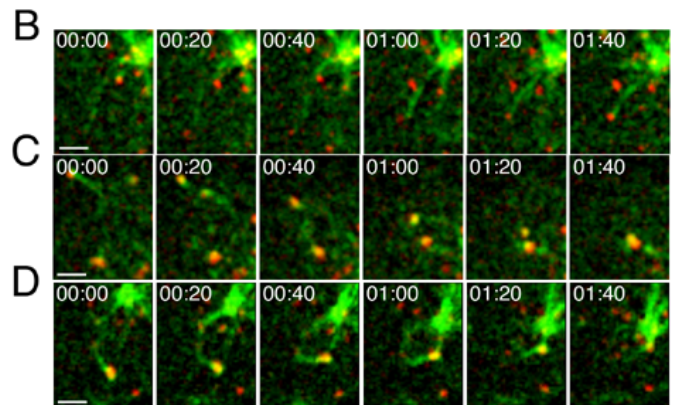
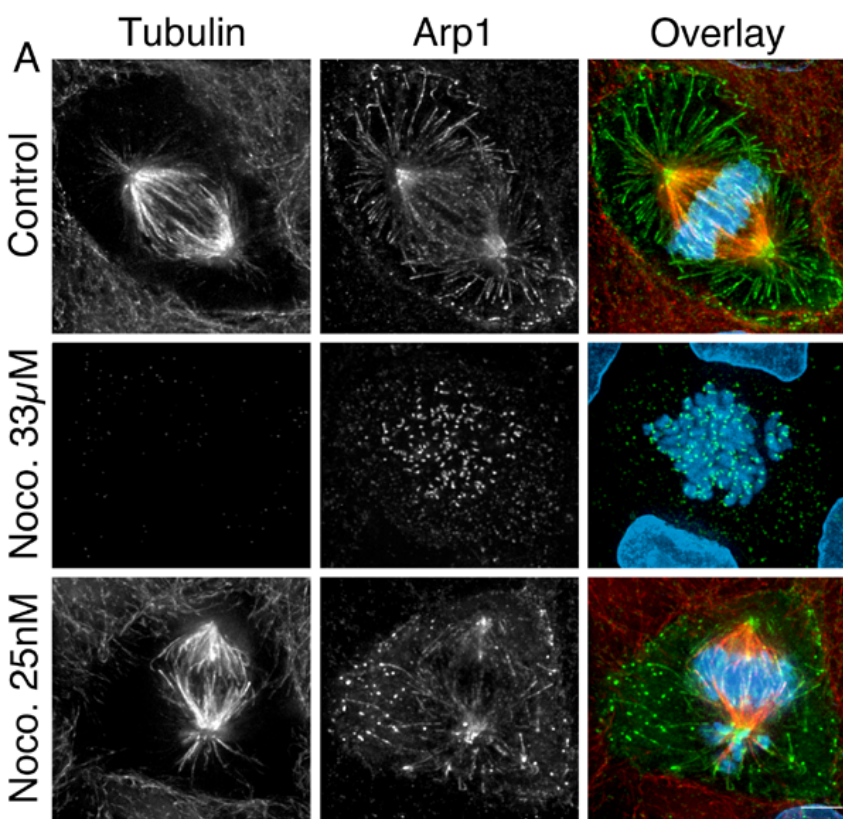
(B-F)-2 *colours-3D-time lapse recording and analysis of the behaviour of LIS1 containing cortical sites and astral microtubules.* Images shown are merged and colorized maximum intensity projections of 34 planes deconvolved stacks of each colour, collected at 20-s intervals. Bars, 2  $\mu\text{m}$ .

(B)- Kinetics of LIS1 arrival at the cell cortex. LIS1 progressively accumulates at the cell cortex at the tip of a stable microtubule. Note that LIS1 is accumulating while the microtubule remains anchored at the cortex. The LIS1 dot was tracked and its signal quantified in the volume (E).

(C)- Fusion of sites at the cell cortex. Several cortical sites can move and fuse in a microtubule dependent way. Coordinates were determined using a homemade 3D tracking module and reported on the graphic shown in (F).

(D)- Internalisation of a cortical site. After it has been contacted by a microtubule, the site detaches from the cell cortex. The microtubule curves and the LIS1 dot fuses with the spindle pole. Bar, 5 $\mu\text{m}$ .

Figure 4



# The IGF-1/Akt Pathway Is Neuroprotective in Huntington's Disease and Involves Huntingtin Phosphorylation by Akt

Sandrine Humbert,<sup>1</sup> Elzbieta A. Bryson,<sup>1</sup>  
Fabrice P. Cordelières,<sup>1</sup> Nathan C. Connors,<sup>2,5</sup>  
Sandeep R. Datta,<sup>2</sup> Steven Finkbeiner,<sup>3</sup>  
Michael E. Greenberg,<sup>2</sup> and Frédéric Saudou<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>UMR 146 CNRS/Institut Curie

Centre Universitaire  
91405 Orsay Cedex  
France

<sup>2</sup>Division of Neuroscience  
Children's Hospital and  
Department of Neurobiology  
Harvard Medical School

Boston, Massachusetts 02115

<sup>3</sup>Gladstone Institute for Neurological Disorders  
University of California, San Francisco  
San Francisco, California 94141

## Summary

In the search for neuroprotective factors in Huntington's disease, we found that insulin growth factor 1 via activation of the serine/threonine kinase Akt/PKB is able to inhibit neuronal death specifically induced by mutant huntingtin containing an expanded polyglutamine stretch. The IGF-1/Akt pathway has a dual effect on huntingtin-induced toxicity, since activation of this pathway also results in a decrease in the formation of intranuclear inclusions of mutant huntingtin. We demonstrate that huntingtin is a substrate of Akt and that phosphorylation of huntingtin by Akt is crucial to mediate the neuroprotective effects of IGF-1. Finally, we show that Akt is altered in Huntington's disease patients. Taken together, these results support a potential role of the Akt pathway in Huntington's disease.

## Introduction

Huntington's disease (HD) is a neurodegenerative disorder characterized by involuntary movements, personality changes, and dementia. The neuropathology of HD involves a selective death of medium spiny neurons of the striatum. The mutation that causes disease is an abnormal expansion of a polyglutamine (polyQ) stretch in the N terminus of the 350 kDa protein huntingtin, and a strong inverse correlation exists between the age at onset in patients and the number of glutamines (Gusella and MacDonald, 2000).

The mechanism by which mutant huntingtin induces selective death of striatal neurons is not well understood. Several studies have revealed a series of events that could ultimately lead to the death of neurons in the striatum (for a review, see Humbert and Saudou, 2001). When huntingtin contains an expanded polyQ stretch, it localizes and aggregates in the nucleus as intranuclear inclusions that are formed of N-terminal fragments of

huntingtin and ubiquitin (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997). Nuclear localization of mutant huntingtin is critical to inducing apoptosis (Saudou et al., 1998; Peters et al., 1999) by possibly altering transcription (for a review, see Cha, 2000). Intranuclear inclusions may not be causative of neuronal death (Klement et al., 1998; Saudou et al., 1998; Cummings et al., 1999; Simeoni et al., 2000), but could still have deleterious effects for the neurons by inducing dysfunction (Davies et al., 1997). In addition, huntingtin could mediate some toxicity in the cytoplasm through interaction with proteins such as HAP-1 or HIP-1 (Li et al., 1995; Hackam et al., 2000) and/or the formation of neuropil aggregates (Li et al., 2000a).

Currently, there is no treatment to prevent or delay the appearance and progression of symptoms or the death of HD patients. Several studies have identified compounds that might be of therapeutic interest in HD: creatine, histone deacetylase inhibitors, minocycline, and antiapoptotic proteins or compounds (Saudou et al., 1998; Chen et al., 2000; Andreassen et al., 2001; Steffan et al., 2001). Because of their ability to promote survival, neurotrophic factors have also been considered as potential therapeutic agents in neurodegenerative disorders. For example, we have shown using an *in vitro* neuronal model of HD that CNTF and BDNF block polyQ-huntingtin-induced cell death (Saudou et al., 1998). *In vivo*, CNTF has also been shown to be neuroprotective in rats and monkeys following excitotoxic lesions that reproduce HD (for a review, see Brouillet et al., 1999). One other interesting growth factor is insulin growth factor 1 (IGF-1), which was shown to have neuroprotective effect in several models (for a review, see Dore et al., 2000) and could be of interest in HD (Alexi et al., 1999). The ability of IGF-1 to promote cell survival has been attributed in part to the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) pathway. Akt, a serine/threonine kinase also known as protein kinase B (PKB) is a potent survival kinase that exerts its effects by acting on key substrates such as components of cell death machinery or transcription factors (for a review, see Brunet et al., 2001).

In this report, we show that IGF-1 and Akt inhibit mutant huntingtin-induced cell death and formation of intranuclear inclusions of polyQ-huntingtin. In addition, we demonstrate that huntingtin phosphorylation by Akt at serine 421 regulates mutant huntingtin-induced toxicity in primary cultures of striatal neurons. These findings reveal that the specific neuroprotective effect of the IGF-1/Akt pathway in HD is mediated by direct phosphorylation of huntingtin. Finally, we present evidence that Akt is altered in HD patients, which further supports a role of the IGF-1/Akt pathway in the context of HD.

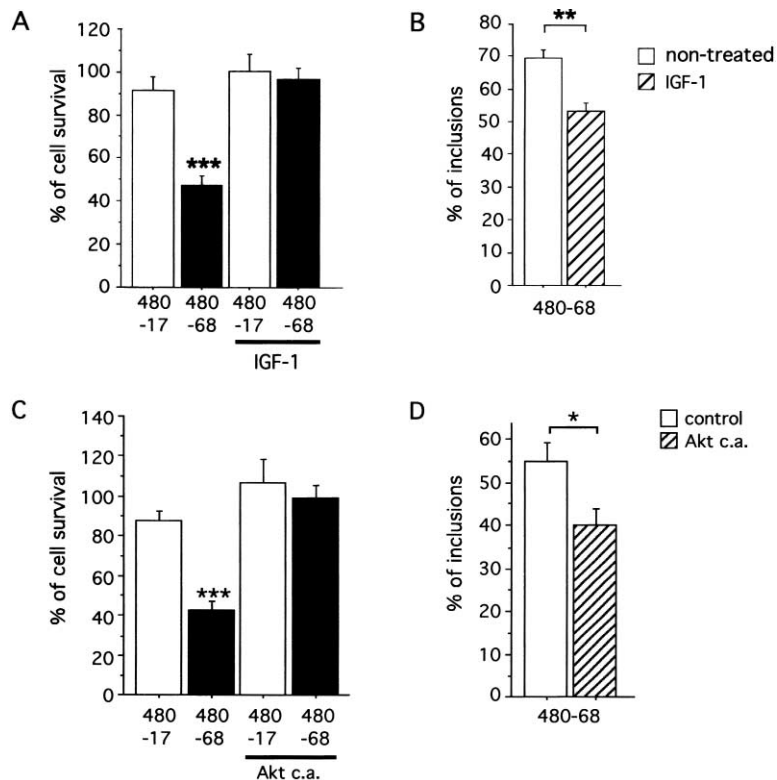
## Results

### IGF-1 Inhibits Mutant Huntingtin-Induced Cell Death and Intranuclear Inclusions

Previously, we have shown that BDNF and CNTF inhibit mutant huntingtin-induced cell death, but lead to an

<sup>4</sup>Correspondence: frederic.saudou@curie.u-psud.fr

<sup>5</sup>Present address: Department of Neuroscience, University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota 55455.



**Figure 1. IGF-1 Treatment and Akt Inhibit Mutant Huntingtin-Induced Cell Death and Intranuclear Inclusion Formation**

(A) Striatal neurons transfected with 480-17/68 constructs are treated with IGF-1. Data from three independent experiments (ANOVA;  $F_{[1,23]} = 17.54$ ;  $P < 0.0001$ ) reveal a statistically significant decrease in survival induced by 480-68 compared to 480-17 without treatment ( $t_{[12]} = 5.97$ ;  $P < 0.0001$ ) but not with IGF-1 treatment ( $t_{[11]} = 0.38$ ; NS). Death induced by 480-68 without treatment is significantly different from all the other cases (Fisher's analysis:  $***P < 0.0001$ ).

(B) Data from three independent transfections reveal a significant decrease in the percentage of cells with intranuclear inclusions induced by the 480-68 construct when treated with IGF-1 ( $t_{[11]} = 4.49$ ;  $**P < 0.001$ ).

(C) 480-17/68 constructs cotransfected with Akt c.a. or with the corresponding empty vector. Data from two independent transfections (ANOVA;  $F_{[1,26]} = 16.79$ ;  $P < 0.0001$ ) reveal a statistically significant decrease in survival induced by 480-68 compared to 480-17 when transfected with empty vector ( $t_{[14]} = 6.53$ ;  $P < 0.0001$ ) but not when transfected with Akt c.a. ( $t_{[12]} = 0.56$ ; NS). Death induced by 480-68 with the empty vector is significantly different from all the other cases (Fisher's analysis:  $***P < 0.0001$ ).

(D) Data from four independent transfections reveal that the percentage of striatal neurons exhibiting intranuclear inclusions is significantly reduced by Akt c.a. ( $t_{[18]} = 2.56$ ;  $*P < 0.05$ ).

increase in the formation of intranuclear inclusions (Saudou et al., 1998). Here, we tested the effect of another neurotrophic factor, IGF-1, on striatal neurons expressing mutant huntingtin. As expected, the 480 amino acid fragment that contains a mutant stretch of 68 glutamines (480-68) induces a statistically significant decrease in cell survival compared to the wild-type 480-17 construct. Interestingly, treatment with IGF-1 completely blocks mutant huntingtin-induced death of striatal neurons (Figure 1A) but, in contrast to BDNF and CNTF treatments, leads to a reduction in the formation of intranuclear inclusions (Figure 1B). Although IGF-1 is effective on the toxicity induced by an N-terminal fragment of mutant huntingtin, similar results were obtained with the physiological form of huntingtin (see Supplemental Figure S1 at <http://www.developmentalcell.com/cgi/content/full/2/6/831/DC1>). Taken together, these results show that IGF-1, in addition to inhibiting mutant huntingtin-induced cell death, leads to a decrease in the formation of intranuclear inclusions.

#### Akt Mediates the Neuroprotective Effect Elicited by IGF-1

We next examined signaling pathways by which IGF-1 is known to suppress apoptosis and found that in striatal neurons, treatment with IGF-1 induces specific activation of Akt through the PI3K pathway (see Supplemental Figure S2). We tested whether the neuroprotective effect of IGF-1 observed in our HD model could be attributed, at least in part, to Akt activation. By cotransfection experiments, we found that Akt completely inhibits neuronal death induced by the 480-68 construct (Figure 1C)

and leads to a decrease in the formation of intranuclear inclusions (Figure 1D). Although we could not evaluate the effect of PI3K inhibition on mutant huntingtin-induced cell death due to the high toxicity of the PI3K inhibitor LY in striatal neurons, we found an increase in the percentage of striatal neurons containing intranuclear inclusions when treated with subtoxic doses of LY (100 nM; data not shown). Taken together, these findings indicate that in striatal neurons, IGF-1, through the activation of the PI3K/Akt pathway, is able to block mutant huntingtin-induced cell death and reduces the formation of intranuclear inclusions.

#### Akt Phosphorylates Huntingtin In Vitro

Akt could either block mutant huntingtin-induced cell death and intranuclear inclusion formation by activating survival signals (Brunet et al., 2001) or by directly acting on huntingtin protein. We analyzed the sequences of huntingtin proteins in various species for the presence of an Akt consensus phosphorylation site (Alessi et al., 1996) and found a putative site conserved between species that we refer to as S421 (serine at position 421 in the human huntingtin with 23 glutamines).

We first asked whether Akt is able to phosphorylate huntingtin within the 480 amino acid N-terminal fragments that were used to show the neuroprotective effect of IGF-1/Akt. We found that an active form of Akt (Akt c.a.) but not an inactive form of Akt (Akt k.n.; Datta et al., 1997), is able to phosphorylate the 480-17/68 fragments of huntingtin (Figure 2A). To demonstrate that S421 in the human huntingtin is phosphorylated by Akt,

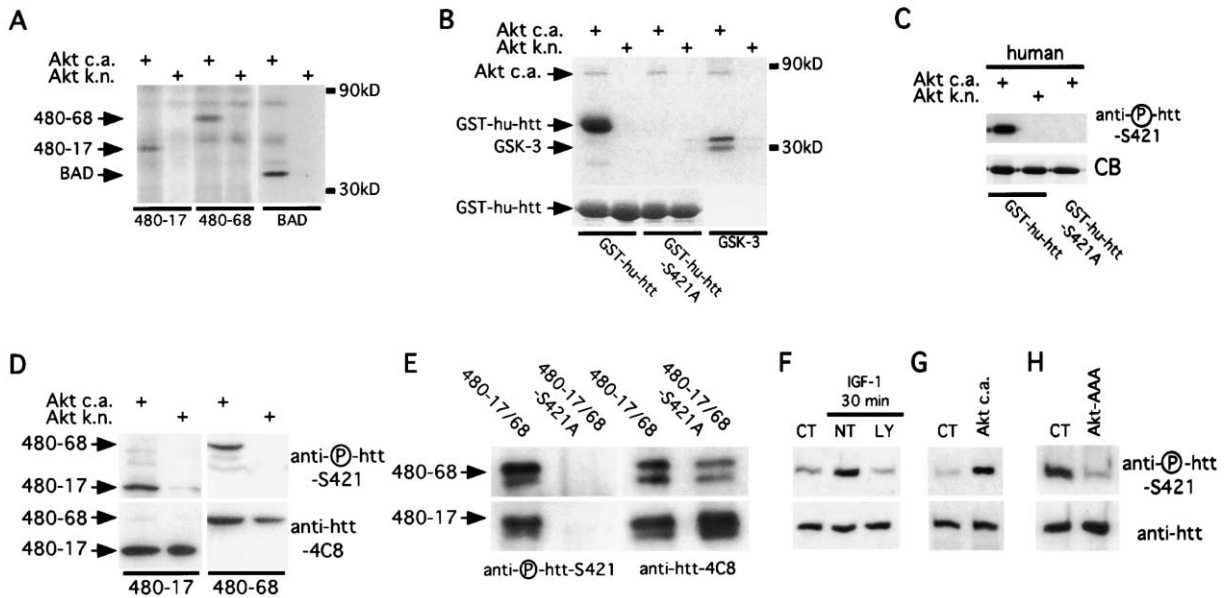


Figure 2. Akt Phosphorylates Huntingtin at S421 In Vitro and In Vivo

(A) Akt phosphorylates the 480-17/68 forms of huntingtin. Huntingtin constructs were produced in 293T cells, immunoprecipitated using 4C8 antibody, and incubated with Akt c.a. or k.n. and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP.  
 (B) In vitro kinase assays were performed using Akt c.a. or k.n. and 4  $\mu$ g of GST-fused proteins as substrates. GST-hu-htt corresponds to GST-fused human huntingtin (amino acids 384–467). The reaction products were resolved by SDS-PAGE, the gel was stained with Coomassie blue (CB, lower panel), and the  $^{32}$ P-labeled proteins were visualized by autoradiography (upper panel). Recombinant BAD (1  $\mu$ g) or GSK-3 fusion protein (1  $\mu$ g; Cell Signaling Technology) were used as positive controls of Akt phosphorylation.  
 (C) Samples obtained as described in (B) were analyzed with anti-P-htt-S421. For immunoblotting, 1/100 of the kinase samples was loaded, whereas for CB, 1/4 of the kinase reaction was loaded.  
 (D and E) 293T cells were transfected with various 480-17/68 constructs and Akt c.a. or k.n. Whole-cell extracts were analyzed with the anti-P-htt-S421 antibody or an anti-htt antibody.  
 (F) IGF-1 leads to phosphorylation of endogenous huntingtin in a PI3K-dependent manner. SH-SY5Y cells were serum starved (48 hr), incubated with 10  $\mu$ M LY 294002 (1 hr), and stimulated with 50 ng/ml IGF-1 (30 min). Immunoblotting experiments were performed using the anti-P-htt-S421 antibody and an anti-htt antibody (2E8). CT, no IGF-1 treatment; NT, no LY treatment prior to IGF-1 stimulation.  
 (G and H) Whole-cell extracts were analyzed as in (F).  
 (G) Akt phosphorylates endogenous huntingtin. 293T cells were transfected with an empty vector (CT) or Akt c.a. and serum starved for 18 hr prior to lysis.  
 (H) Endogenous huntingtin phosphorylation is reduced by a dominant interfering form of Akt. 293T cells were transfected with an empty vector (CT) or Akt-AAA. Transfected cells were selected by FACS.

we generated huntingtin GST-fused proteins containing either an intact S421 or a serine to alanine mutation at this site. As shown in Figure 2B, GST-hu-htt is phosphorylated, while GST-hu-htt-S421A is no longer detectably phosphorylated by Akt. This shows that S421 is a site of phosphorylation by Akt in huntingtin.

To unequivocally identify S421 as an Akt site, we raised a polyclonal antibody that specifically recognizes huntingtin phosphorylated at S421. As shown in Figure 2C, the antibody to phosphorylated huntingtin S421 (anti-P-htt-S421) recognizes GST-hu-htt that was incubated with Akt c.a. but fails to recognize nonphosphorylated GST-hu-htt or GST-hu-htt-S421A. These results demonstrate that anti-P-htt-S421 specifically recognizes huntingtin when phosphorylated at S421 and that Akt phosphorylates huntingtin at S421 in vitro. Similar results were obtained with the mouse huntingtin sequences (see Supplemental Figure S3).

#### Akt Phosphorylates Huntingtin In Vivo

To determine whether Akt phosphorylation of huntingtin at S421 occurs in cells, we cotransfected 293T cells

with 480-17 or 480-68 with Akt c.a. or k.n. We found that Akt c.a. induces a phosphorylation of huntingtin at S421 (Figure 2D), indicating that active Akt alone is sufficient to induce the phosphorylation of huntingtin at S421. We then generated versions of 480-17/68 constructs with an S421A mutation and expressed them in 293T cells with Akt c.a. (Figure 2E). Levels of huntingtin were monitored using the 4C8 antibody, revealing no differences in expression due to the S421A mutation. The anti-P-htt-S421 recognizes 480-17/68 fragments of huntingtin but fails to recognize the proteins with the S421A mutation. Thus, we demonstrate that Akt phosphorylates the 480-17/68 forms of huntingtin in 293T cells at S421.

To test whether endogenous huntingtin becomes phosphorylated in response to IGF-1, we exposed human neuroblastoma SH-SY5Y cells to IGF-1. This treatment induces phosphorylation of huntingtin at S421 as revealed by anti-P-htt-S421 while the total level of huntingtin protein remained unchanged (Figure 2F). Phosphorylation of huntingtin was reduced when cells were treated with the PI3K inhibitor LY. We found that the



expression of Akt c.a. induces phosphorylation of endogenous huntingtin at S421 (Figure 2G), demonstrating that the observed phosphorylation of S421 in endogenous huntingtin can be due to Akt. We then asked whether the phosphorylation of endogenous huntingtin at S421 can be reduced by the presence of a dominant interfering form of Akt, Akt-AAA (Wang et al., 1999). 293T cells were transfected with GFP and Akt-AAA (1:20 ratio). To increase the percentage of cells expressing the Akt-AAA construct, GFP-positive cells were selected by FACS (Figure 2H). In contrast to FACS-sorted cells transfected with an empty vector, cells expressing Akt-AAA show reduced phosphorylation of endogenous huntingtin at S421. Altogether, our findings indicate that in cells, phosphorylation of endogenous human huntingtin is induced by IGF-1 through a PI3K-dependent mechanism and that huntingtin is a physiological substrate of Akt.

To determine whether phosphorylation of huntingtin at S421 occurs in the neuronal model in which mutant huntingtin-induced cell death is blocked by IGF-1, we analyzed the status of huntingtin phosphorylation at S421 after IGF-1 treatment (Figure 3A). Whereas the anti-P-htt-S421 antibody stains neurons transfected with the 480-17/68 constructs, the S421A mutation abolished the anti-P-htt-S421 staining. The S421A mutants of huntingtin are localized in the cytoplasm and neurites of striatal neurons as for wild-type and polyQ-huntingtin. Taken together, these data demonstrate that in 293T cells, human neuroblastoma cells, and striatal neurons, IGF-1 induces phosphorylation of huntingtin at S421.

#### **Mutant Huntingtin-Induced Toxicity Is Regulated by Phosphorylation at S421**

To analyze the biological relevance of huntingtin S421 phosphorylation, we tested the effect of the S421A mutation in huntingtin on cell survival. We found that the 480-68 and 480-68-S421A constructs elicit similar loss of survival in striatal neurons (Figure 3B). We next compared the ability of IGF-1 to increase the survival of neurons expressing the 480-68 constructs with or without the S421A mutation. Interestingly, while IGF-1 is able to completely inhibit death induced by the 480-68 construct, survival was not fully recovered by IGF-1 treatment with the 480-68-S421A construct. This result demonstrates that the complete inhibition of mutant huntingtin-induced cell death by IGF-1 requires the presence of an intact S421 in huntingtin protein. It is worthwhile to note that we observed an increase in the survival of neurons expressing the 480-68-S421A after IGF-1 treatment (Figure 3B). This indicates that IGF-1, in addition to promoting survival through the phosphorylation of huntingtin at serine 421, elicits some neuroprotection against mutant huntingtin by other mechanisms.

We next asked whether constitutive phosphorylation of huntingtin at S421 is able to reduce toxicity of mutant huntingtin. To test this hypothesis, we generated a 480-68 construct in which serine 421 is changed into an aspartic acid to mimic constitutive phosphorylation. With this S421D mutation, we found that polyQ-huntingtin is no longer able to induce neuronal death (Figure 3C) and leads to a reduction in the percentage of neurons containing intranuclear inclusions (Figure 3D). The effect is not due to differences in expression levels, since the

480-17/68-S421D are expressed in 293T cells and neurons at similar levels as the 480-17/68 constructs (data not shown).

Taken together, these results indicate that phosphorylation of huntingtin at S421 is critical to regulating mutant huntingtin-induced cell death and intranuclear inclusion formation.

#### **Full-Length Akt Appears as a Shorter Form in the Striatum of HD Patients**

Since we show that the IGF-1/Akt pathway blocks mutant huntingtin-induced toxicity, we examined the level of Akt in brain samples from HD patients. It is well established that in HD there is a selective atrophy of the brain, with the striatum being affected the most severely. Shrinkage and loss of neurons in the cerebral cortex are also observed but to a lesser extent, while the cerebellum is usually unaffected. We analyzed by anti-Akt immunoblotting human samples from control (CT) and HD grade 4 (HD4) and grade 3 (HD3) patients from three regions of the brain: cerebellum, cortex, and striatum (Figure 4). Anti- $\beta$ -actin antibody is used as a control for protein levels. Interestingly, in several human brain samples, Akt appears as two species with relative molecular masses ( $M_r$ ) of 60 and 49 kDa. These two species have already been characterized as Akt full-length ( $M_r$ , 60 kDa) and a caspase-3-generated Akt product ( $M_r$ , 49 kDa; Bachelder et al., 1999; Francois and Grimes, 1999; Rokudai et al., 2000). In the CT samples, from the cerebellum, cortex, and striatum, the lower Akt species is absent, except for sample 3 where a weak signal is observed in the cortex. In contrast, in HD patients the shorter Akt product is observed in the cerebellum for HD samples 5–9 and in the cortex for HD samples 4 and 6–8. More strikingly, in the striatum, the two HD samples show a high accumulation of the lower species in comparison to the CT samples, where the 49 kDa species is totally absent. Furthermore, in the striatum of HD patients, full-length Akt is either low (sample 5) or almost undetectable (sample 9; a weak band appears after overexposure; data not shown). We could not detect phosphorylated forms of huntingtin and Akt in brain samples, probably due to postmortem intervals (data not shown).

In conclusion, we observed a pronounced alteration of Akt in the most affected brain region of HD patients, the striatum. These observations further support a potential role of Akt in HD.

#### **Discussion**

We show here that phosphorylation of S421 in polyQ-huntingtin abrogates its proapoptotic activity. The absence of phosphorylation at S421 or its constitutive phosphorylation do not appear to affect the level of expression or the subcellular localization of huntingtin. Further, phosphorylation of huntingtin at S421 does not modify its ability to be ubiquitinated or degraded (data not shown). In addition, we do not observe any effects of the phosphorylation at S421 on the cleavage of huntingtin by calpain or caspases -1 and -3 (data not shown). Huntingtin interacts with several proteins (Humbert and Saudou, 2001). It is possible that phosphorylation alters

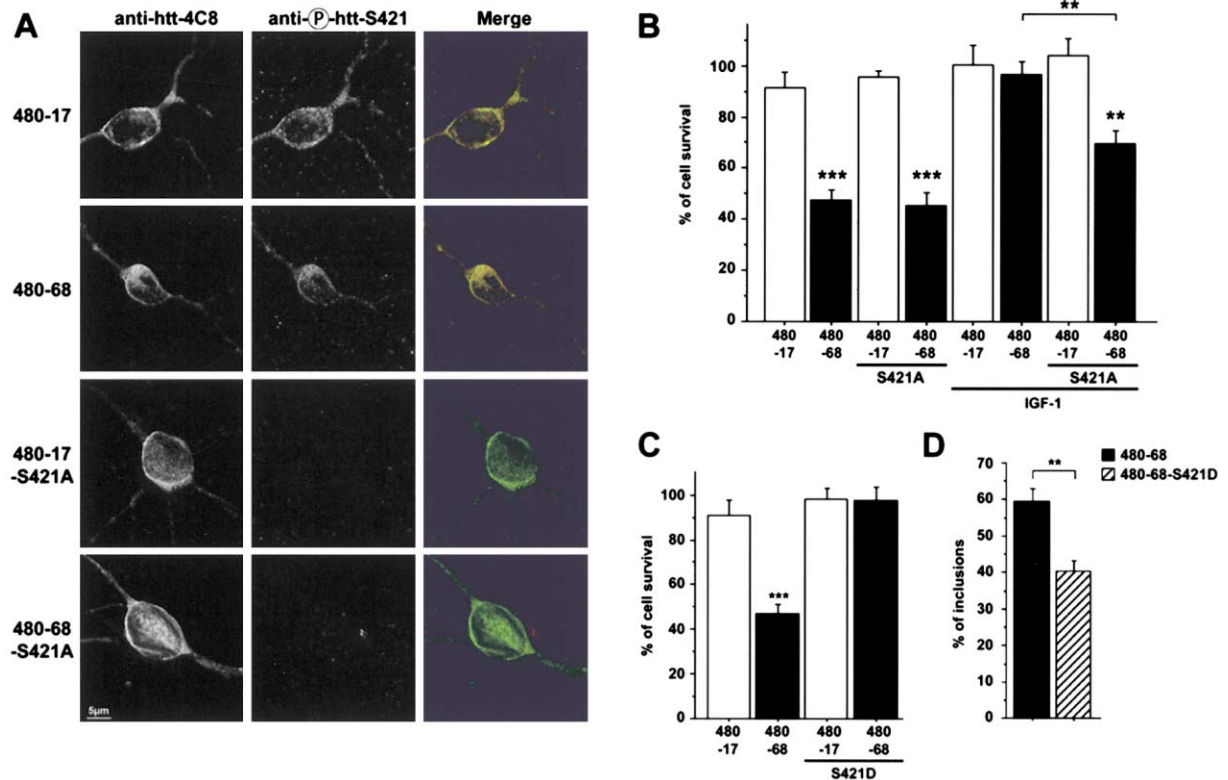


Figure 3. Phosphorylation of S421 Regulates Mutant Huntingtin-Induced Toxicity

(A) Huntingtin is phosphorylated at S421 in striatal neurons. Striatal neurons were transfected, treated with IGF-1 (50 ng/ml; 1 hr), fixed, immunostained with the 4C8 and anti-P-htt-S421 antibodies, and analyzed by deconvolution microscopy.

(B) IGF-1 suppresses mutant huntingtin-mediated cell death in an S421 phosphorylation-dependent manner. Data from three independent experiments (ANOVA;  $F_{[3,45]} = 18.44$ ;  $P < 0.0001$ ) reveal that survival induced by IGF-1 on the 480-68-S421A construct is significantly lower than the survival induced by IGF-1 on the 480-68 construct ( $t_{[12]} = 3.53$ ;  $**P < 0.01$ ) and, significantly different from all other cases (Fisher's analysis:  $**P < 0.01$ ). Death induced by the 480-68 and 480-68-S421A constructs without treatment is significantly different from all the other cases (Fisher's analysis:  $***P < 0.0001$ ).

(C) S421D mutation of huntingtin abolishes polyQ-dependent cell death. Data from three independent experiments (ANOVA;  $F_{[3,26]} = 23.97$ ;  $P < 0.0001$ ) reveal that survival induced by the 480-68-S421D construct is significantly higher than the survival induced by the 480-68 construct ( $t_{[13]} = 7.48$ ;  $P < 0.0001$ ) but not from the survival elicited by the 480-17 construct ( $t_{[13]} = 0.86$ ; NS) or the 480-17-S421D construct ( $t_{[14]} = 0.057$ ; NS). Death induced by the 480-68 construct is significantly different from all the other cases (Fisher's analysis:  $***P < 0.0001$ ).

(D) Data from two independent transfections revealed that the percentage of intranuclear inclusions formed by the 480-68-S421D is lower than for the 480-68 construct ( $t_{[9]} = 4.55$ ;  $**P = 0.002$ ).

the ability of huntingtin to interact with a yet to be identified protein.

Although we find that the complete neuroprotective effect mediated by IGF-1 requires phosphorylation of mutant huntingtin at S421, in the absence of phosphorylation of huntingtin, IGF-1 is still able to induce some neuroprotection. This suggests that in the context of mutant huntingtin-induced cell death, IGF-1 mediates its neuroprotective effect not only via a direct action of Akt on huntingtin protein but also via the phosphorylation of other substrates that increase neuronal survival. Several substrates of Akt such as Bad, FOXOs, and caspase-9 that promote neuronal survival when phosphorylated by Akt have been described (Brunet et al., 2001). Those substrates, as well as others that remain to be identified, could also participate in mediating the neuroprotective effect elicited by IGF-1 and Akt on mutant huntingtin-induced cell death.

Expansion of CAG trinucleotide repeats in otherwise unrelated proteins is known to be the cause of at least

nine neurodegenerative disorders, including HD. Our experiments demonstrate that toxicity of mutant huntingtin can be inhibited by direct phosphorylation and raise the possibility that phosphorylation by Akt could also abrogate the toxicity of other proteins containing an expanded polyQ tract. One interesting candidate is the androgen receptor whose CAG expansion results in spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA) or Kennedy's disease (Fischbeck et al., 1999). Indeed, the androgen receptor has recently been shown to be a substrate of Akt (Lin et al., 2001). However, it is not known whether this phosphorylation plays a role in the toxicity induced by the mutant polyQ androgen receptor. By scanning proteins that contain an expanded polyQ stretch and that are responsible for this class of neurodegenerative disorders, we found, for example, that ataxin-1, the protein responsible for spinal and cerebellar ataxia type 1, contains a putative phosphorylation site for Akt (data not shown). If phosphorylation by Akt inhibits death induced by mutant ataxin-1, together with this study, we



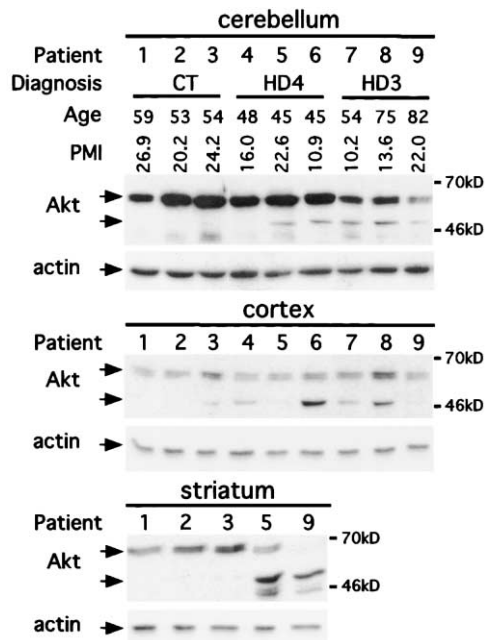


Figure 4. Akt Appears as a Shorter Form in Huntington's Disease Patients

Protein extracts were prepared from cerebellar, cortical (Brodmann area 9), or striatal postmortem samples, resolved by SDS-PAGE, and immunoblotted with anti-Akt or anti- $\beta$ -actin antibodies. Brain tissues are from control (CT; samples 1–3) and HD grade 4 (HD4; samples 4–6) and grade 3 (HD3; samples 7–9) patients. PMI (hr), postmortem interval.

would have evidence for a common mechanism of neuroprotection in polyQ tract neurodegenerative disorders.

Features of apoptosis within the degenerating neurons are observed in postmortem brains from HD patients (Portera-Cailliau et al., 1995). Activation of apoptosis has also been reported in mouse and cellular models of HD and could be associated with an activation of caspases (Reddy et al., 1998; Saudou et al., 1998; Hackam et al., 2000; Li et al., 2000b). Caspases cleave specific target proteins during apoptotic death including signaling molecules that promote cell survival. In particular, Akt has been shown to be negatively regulated by apoptotic signaling pathways in vivo (Widmann et al., 1998; Bachelder et al., 1999). In vitro, Akt is cleaved by caspase-3, resulting in the generation of a shorter fragment of Akt ( $M_r$ , 49 kDa; Bachelder et al., 1999; Francois and Grimes, 1999; Rokudai et al., 2000). Interestingly, we observe a high accumulation of a 49 kDa species of Akt in the striatum of HD patients. One could hypothesize that in HD patients, this short product is the result of caspase cleavage. This cleavage may subsequently lead to inactivation of Akt as previously reported in other systems (Bachelder et al., 1999; Francois and Grimes, 1999; Rokudai et al., 2000).

By studying the mechanism of neuroprotection elicited by the IGF-1/Akt pathway in the context of HD, we have revealed a new mechanism by which Akt is able to counteract the proapoptotic properties of mutant huntingtin. Understanding the molecular basis of the inhibition of mutant huntingtin-induced toxicity by Akt

as well as developing drugs that activate and/or prevent alteration of the Akt pathway could possibly lead to new therapeutic interventions in HD.

#### Experimental Procedures

Descriptions of constructs, cell culture, transfection, and protein extracts may be found as supplemental data at <http://www.developmentalcell.com/cgi/content/full/2/6/831/DC1>.

#### Huntingtin Phospho-Antibody S421

A phosphopeptide of the following sequence was synthesized: CSGGRSRSgpSIVELI, and coupled to KLH (Neosystem, Illkirch, France). A polyclonal antibody to the KLH-coupled peptide was obtained and affinity purified as previously described (Neosystem; Datta et al., 1997).

#### Brain Tissues

Tissues were obtained from the Harvard Brain Tissue Resource Center as follows: three controls (samples 1–3), three HD grade 4 (samples 4–6), and three grade 3 (samples 7–9) patients. Samples 1–9 correspond, respectively, to brain numbers 4741, 4744, 4751, 4680, 4740, 4798, 4719, 4754, and 4797 as numbered by the Harvard Brain Tissue Resource Center.

#### Immunocytochemistry and Immunoblotting

Antibodies used include anti-huntingtin 4C8 and 2E8 (ICC, 1:500; WB, 1:5000; Trotter et al., 1995), anti-phospho-huntingtin-S421 (ICC, 1:100; WB, 1:200), anti-ubiquitin (1:100; DAKO), anti-Akt (1:1000; New England Biolabs), anti-phospho-Akt Ser473 (1:1000; New England Biolabs), and monoclonal anti- $\beta$ -actin AC15 (1:5000; Sigma).

#### Measurement of Neuronal Survival and Intranuclear Inclusions

For survival assays, striatal neurons were transfected with the plasmids of interest and the CMV-GFP plasmid (6:1 ratio). Twelve hours and 2 days after transfection, GFP-positive neurons were scored under fluorescence microscopy in a blinded manner. For intranuclear inclusion scoring, transfected and immunostained neurons 6 days after transfection were analyzed for the presence of ubiquitin-positive intranuclear inclusions in a blinded manner. Each graph represents two to three independent experiments performed in triplicates. Data are expressed as the mean value  $\pm$  SEM. Each bar in a given graph corresponds to the scoring of about 2000 neurons in cell death experiments and to 500 neurons for inclusions scoring.

#### Kinase Assays

293T cells were transfected with HA-Akt vectors. Twenty-four hours after transfection, extracts were obtained and kinase assays were performed as described (Datta et al., 1997).

#### Acknowledgments

We thank G. Poizat for technical support. We thank Prof. M.E. MacDonald and Drs. F. Persichetti, Y. Gotoh, and N. Masuyama for helpful discussions and for the gift of constructs. We thank M. Hours and the IFR46 (Paris XI University) for the FACS experiments, S. Saule for support, and A. Brunet, J. De Mey, L. Gauthier, and H. Rangone for valuable discussions. We acknowledge the Harvard Brain Tissue Resource Center (Belmont, MA), which is supported in part by PHS grant number MH/NS 31862, for providing human brain tissue. This research was supported by grants from CNRS-ATiPE (F.S.), Association pour la Recherche sur le Cancer, ARC 9095 (F.S.), Fondation pour la Recherche Médicale-INE and BNP-Paribas (F.S.), Hereditary Disease Foundation Cure HD Initiative (F.S.), NINDS R01 NS39074 (S.F.), the Howard Hughes M.R.R.P. (#76296-549901; S.F.), the J.D. Gladstone Institutes (S.F.), NIH P01 HD24926 (M.E.G.), the Mental Retardation Research Center HD18655 (M.E.G.), and the F.M. Kirby Foundation (M.E.G.). F.S. and S.H. are investigators from INSERM. S.H. acknowledges previous support from ARC. E.A.B. is supported by CNRS and acknowledges previous support from Institut Curie.

Received: October 24, 2001

Revised: April 22, 2002

## References

- Alessi, D.R., Caudwell, F.B., Andjelkovic, M., Hemmings, B.A., and Cohen, P. (1996). Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 399, 333–338.
- Alexi, T., Hughes, P.E., van Roon-Mom, W.M., Faull, R.L., Williams, C.E., Clark, R.G., and Gluckman, P.D. (1999). The IGF-I amino-terminal tripeptide glycine-proline-glutamate (GPE) is neuroprotective to striatum in the quinolinic acid lesion animal model of Huntington's disease. *Exp. Neurol.* 159, 84–97.
- Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Ferrante, R.J., Jenkins, B.G., Ferrante, K.L., Thomas, M., Friedlich, A., Browne, S.E., Schilling, G., Borchelt, D.R., et al. (2001). Creatine increases survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. *Neurobiol. Dis.* 8, 479–491.
- Bachelder, R.E., Ribick, M.J., Marchetti, A., Falcioni, R., Soddu, S., Davis, K.R., and Mercurio, A.M. (1999). p53 inhibits  $\alpha 6 \beta 4$  integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *J. Cell Biol.* 147, 1063–1072.
- Brouillet, E., Conde, F., Beal, M.F., and Hantraye, P. (1999). Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog. Neurobiol.* 59, 427–468.
- Brunet, A., Datta, S.R., and Greenberg, M.E. (2001). Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 297–305.
- Cha, J.H. (2000). Transcriptional dysregulation in Huntington's disease. *Trends Neurosci.* 23, 387–392.
- Chen, M., Ona, V.O., Li, M., Ferrante, R.J., Fink, K.B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L.A., Hersch, S.M., et al. (2000). Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat. Med.* 6, 797–801.
- Cummings, C.J., Reinstein, E., Sun, Y., Antalffy, B., Jiang, Y., Ciechanover, A., Orr, H.T., Beaudet, A.L., and Zoghbi, H.Y. (1999). Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron* 24, 879–892.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231–241.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537–548.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990–1993.
- Dore, S., Kar, S., Zheng, W.H., and Quirion, R. (2000). Rediscovering good old friend IGF-I in the new millennium: possible usefulness in Alzheimer's disease and stroke. *Pharm. Acta Helv.* 74, 273–280.
- Fischbeck, K.H., Lieberman, A., Bailey, C.K., Abel, A., and Merry, D.E. (1999). Androgen receptor mutation in Kennedy's disease. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 354, 1075–1078.
- Francois, F., and Grimes, M.L. (1999). Phosphorylation-dependent Akt cleavage in neural cell in vitro reconstitution of apoptosis. *J. Neurochem.* 73, 1773–1776.
- Gusella, J.F., and MacDonald, M.E. (2000). Molecular genetics: unmasking polyglutamine triggers in neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 109–115.
- Hackam, A.S., Yassa, A.S., Singaraja, R., Metzler, M., Gutekunst, C.A., Gan, L., Warby, S., Wellington, C.L., Vaillancourt, J., Chen, N., et al. (2000). Huntingtin interacting protein 1 (HIP-1) induces apoptosis via a novel caspase-dependent death effector domain. *J. Biol. Chem.* 275, 41299–41308.
- Humbert, S., and Saudou, F. (2001). Neuronal death in Huntington's disease: multiple pathways for one issue? In *Neuronal Death by Accident or by Design*, C.E. Henderson, D. Green, J. Mariani, and Y. Christen, eds. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 137–152.
- Klement, I.A., Skinner, P.J., Kaytor, M.D., Yi, H., Hersch, S.M., Clark, H.B., Zoghbi, H.Y., and Orr, H.T. (1998). Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell* 95, 41–53.
- Li, X.J., Li, S.H., Sharp, A.H., Nucifora, F.C., Jr., Schilling, G., Lanhahan, A., Worley, P., Snyder, S.H., and Ross, C.A. (1995). A huntingtin-associated protein enriched in brain with implications for pathology. *Nature* 378, 398–402.
- Li, H., Li, S.H., Johnston, H., Shelbourne, P.F., and Li, X.J. (2000a). Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat. Genet.* 25, 385–389.
- Li, S.H., Lam, S., Cheng, A.L., and Li, X.J. (2000b). Intranuclear huntingtin increases the expression of caspase-1 and induces apoptosis. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2859–2867.
- Lin, H.K., Yeh, S., Kang, H.Y., and Chang, C. (2001). Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7200–7205.
- Peters, M.F., Nucifora, F.C., Jr., Kushi, J., Seaman, H.C., Cooper, J.K., Herring, W.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M., and Ross, C.A. (1999). Nuclear targeting of mutant Huntingtin increases toxicity. *Mol. Cell. Neurosci.* 14, 121–128.
- Portera-Cailliau, C., Hedreen, J.C., Price, D.L., and Koliatsos, V.E. (1995). Evidence for apoptotic cell death in Huntington disease and excitotoxic animal models. *J. Neurosci.* 15, 3775–3787.
- Reddy, P.H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W.O., Jr., Miller, G., and Tagle, D.A. (1998). Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat. Genet.* 20, 198–202.
- Rokudai, S., Fujita, N., Hashimoto, Y., and Tsuruo, T. (2000). Cleavage and inactivation of antiapoptotic Akt/PKB by caspases during apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 182, 290–296.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., and Greenberg, M.E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell* 95, 55–66.
- Simeoni, S., Mancini, M.A., Stenoien, D.L., Marcelli, M., Weigel, N.L., Zanisi, M., Martini, L., and Poletti, A. (2000). Motoneuronal cell death is not correlated with aggregate formation of androgen receptors containing an elongated polyglutamine tract. *Hum. Mol. Genet.* 9, 133–144.
- Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., et al. (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413, 739–743.
- Trottier, Y., Devys, D., Imbert, G., Saudou, F., An, I., Lutz, Y., Weber, C., Agid, Y., Hirsch, E.C., and Mandel, J.L. (1995). Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form. *Nat. Genet.* 10, 104–110.
- Wang, Q., Somwar, R., Bilan, P.J., Liu, Z., Jin, J., Woodgett, J.R., and Klip, A. (1999). Protein kinase B/Akt participates in GLUT4 translocation by insulin in myoblasts. *Mol. Cell. Biol.* 19, 4008–4018.
- Widmann, C., Gibson, S., and Johnson, G.L. (1998). Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J. Biol. Chem.* 273, 7141–7147.

# *Bibliographie*

---

## Bibliographie

- Abrieu, A., L. Magnaghi-Jaulin, J.A. Kahana, M. Peter, A. Castro, S. Vigneron, T. Lorca, D.W. Cleveland, and J.C. Labbe. 2001. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell*. 106:83-93.
- Adames, N.R., and J.A. Cooper. 2000. Microtubule interactions with the cell cortex causing nuclear movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 149:863-874.
- Akhmanova, A., C.C. Hoogenraad, K. Drabek, T. Stepanova, B. Dortland, T. Verkerk, W. Vermeulen, B.M. Burgering, C.I. De Zeeuw, F. Grosveld, and N. Galjart. 2001. CLASPs Are CLIP-115 and -170 Associating Proteins Involved in the Regional Regulation of Microtubule Dynamics in Motile Fibroblasts. *Cell*. 104:923-935.
- Allan, V. 1996a. Role of motor proteins in organizing the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Seminars Cell Dev. Biol*. 7:335-342.
- Allan, V. 2000. Dynactin. *Curr Biol*. 10:R432.
- Allan, V., and I.S. Nathke. 2001. Catch and pull a microtubule: getting a grasp on the cortex. *Nat Cell Biol*. 3:E226-E228.
- Allan, V.J. 1994. Dynactin: portrait of a dynein regulator. *Current biology*. 4:1000-1002.
- Allan, V.J. 1995. Protein phosphatase 1 regulates the cytoplasmic dynein-driven formation of endoplasmic reticulum networks in vitro. *J Cell Biol*. 128:879-891.
- Allan, V.J. 1996b. Motor proteins: a dynamic duo. *Curr Biol*. 6:630-633.
- Allen, W.E., G.E. Jones, J.W. Pollard, and A.J. Ridley. 1997. Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci*. 110 ( Pt 6):707-20.
- Allen, W.E., D. Zicha, A.J. Ridley, and G.E. Jones. 1998. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol*. 141:1147-57.
- Amano, M., Y. Fukata, and K. Kaibuchi. 2000. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res*. 261:44-51.
- Amos, L., and A. Klug. 1974. Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J Cell Sci*. 14:523-49.
- Ando, S., H. Yang, N. Nozaki, T. Okazaki, and K. Yoda. 2002. CENP-A, -B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells. *Mol Cell Biol*. 22:2229-41.
- Antonio, C., I. Ferby, H. Wilhelm, M. Jones, E. Karsenti, A.R. Nebreda, and I. Vernos. 2000. Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell*. 102:425-435.
- Asai, D.J., and M.P. Koonce. 2001. The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution. *Trends Cell Biol*. 11:196-202.
- Askham, J.M., P. Moncur, A.F. Markham, and E.E. Morrison. 2000. Regulation and function of the interaction between the APC tumour suppressor protein and EB1. *Oncogene*. 19:1950-1958.
- Baird, G.S., D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:11984-11989.
- Barkalow, K., T. Hamasaki, and P. Satir. 1994. Regulation of 22S dynein by a 29-kD light chain. *J Cell Biol*. 126:727-35.
- Barry, A.E., E.V. Howman, M.R. Cancilla, R. Saffery, and K.H. Choo. 1999. Sequence analysis of an 80 kb human neocentromere. *Hum Mol Genet*. 8:217-27.
- Bastiaens, P.I., and R. Pepperkok. 2000. Observing proteins in their natural habitat: the living cell. *Trends Biochem Sci*. 25:631-637.
- Beach, D.L., J. Thibodeaux, P. Maddox, E. Yeh, and K. Bloom. 2000. The role of the proteins Kar9 and Myo2 in orienting the mitotic spindle of budding yeast. *Curr Biol*. 10:1497-1506.

- Beckwith, S.M., C.H. Roghi, B. Liu, and N. Ronald Morris. 1998. The "8-kD" cytoplasmic dynein light chain is required for nuclear migration and for dynein heavy chain localization in *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol.* 143:1239-1247.
- Beinhauer, J.D., I.M. Hagan, J.H. Hegemann, and U. Fleig. 1997. Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *J Cell Biol.* 139:717-728.
- Benashski, S.E., A. Harrison, R.S. Patel-King, and S.M. King. 1997. Dimerization of the highly conserved light chain shared by dynein and myosin V. *J Biol Chem.* 272:20929-35.
- Berg, J.M. 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science.* 232:485-487.
- Berlin, V., C.A. Styles, and G.R. Fink. 1990. BIK1, a protein required for microtubule function during mating and mitosis in *Saccharomyces cerevisiae*, colocalizes with tubulin. *J Cell Biol.* 111:2573-2586.
- Berrueta, L., S.K. Kraeft, J.S. Tirnauer, S.C. Schuyler, L.B. Chen, D.E. Hill, D. Pellman, and B.E. Bierer. 1998. The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10596-10601.
- Berrueta, L., J.S. Tirnauer, S.C. Schuyler, D. Pellman, and B.E. Bierer. 1999. The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr Biol.* 9:425-428.
- Bershadsky, A.D., E.A. Vaisberg, and J.M. Vasiliev. 1991. Pseudopodial activity at the active edge of migrating fibroblast is decreased after drug-induced microtubule depolymerization. *Cell Motil Cytoskeleton.* 19:152-8.
- Best, A., S. Ahmed, R. Kozma, and L. Lim. 1996. The Ras-related GTPase Rac1 binds tubulin. *J Biol Chem.* 271:3756-62.
- Bienz, M. 2001. Spindles cotton on to junctions, APC and EB1. *Nat Cell Biol.* 3:E67-E68.
- Bienz, M. 2002. The subcellular destinations of APC proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:328-338.
- Bilbe, G., J. Delabie, J. Brüggem, H. Richener, F.A.M. Asselbergs, N. Cerletti, C. Sorg, K. Odink, L. Tarcsay, W. Wiesendanger, C. DeWolf-Peeters, and R. Shipman. 1992. Restin: a novel intermediate filament-associated protein highly expressed in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *EMBO journal.* 11:2103-2113.
- Blangy, A., L. Arnaud, and E.A. Nigg. 1997. Phosphorylation by p34cdc2 protein kinase regulates binding of the kinesin-related motor HsEg5 to the dynactin subunit p150. *J Biol Chem.* 272:19418-19424.
- Blangy, A., H.A. Lane, P. d'Herin, M. Harper, M. Kress, and E.A. Nigg. 1995. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell.* 83:1159-69.
- Bloom, G.S., T.A. Schoenfeld, and R.B. Vallee. 1984. Widespread distribution of the major polypeptide component of MAP 1 (microtubule-associated protein 1) in the nervous system. *J Cell Biol.* 98:320-330.
- Bloom, K. 2001. Nuclear migration: cortical anchors for cytoplasmic dynein. *Curr Biol.* 11:R326-R329.
- Blower, M.D., and G.H. Karpen. 2001. The role of *Drosophila* CID in kinetochore formation, cell-cycle progression and heterochromatin interactions. *Nat Cell Biol.* 3:730-9.
- Bootsma, D., L. Budke, and O. Vos. 1964. Studies on synchronous division of tissue culture cells initiated by excess thymidine. *Exp Cell Res.* 33:301-309.
- Bornens, M. 2002. Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol.* 14:25-34.
- Bowman, A.B., R.S. Patel-King, S.E. Benashski, J.M. McCaffery, L.S. Goldstein, and S.M. King. 1999. *Drosophila* roadblock and *Chlamydomonas* LC7: a conserved family of dynein-associated proteins involved in axonal transport, flagellar motility, and mitosis. *J Cell Biol.* 146:165-180.
- Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science.* 296:550-553.
- Brunner, D. 2002. How to grab a microtubule on the move. *Dev Cell.* 3:2-4.

- Brunner, D., and P. Nurse. 2000. CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell*. 102:695-704.
- Burkhardt, J.K., C.J. Echeverri, T. Nilsson, and R.B. Vallee. 1997. Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol*. 139:469-484.
- Busson, S., D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre, and J.R. De Mey. 1998. Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Current biology*. 8:541-544.
- Cahana, A., T. Escamez, R.S. Nowakowski, N.L. Hayes, M. Giacobini, A. von Holst, O. Shmueli, T. Sapir, S.K. McConnell, W. Wurst, S. Martinez, and O. Reiner. 2001. Targeted mutagenesis of Lis1 disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:6429-6434.
- Cai, M., and R.W. Davis. 1990. Yeast centromere binding protein CBF1, of the helix-loop-helix protein family, is required for chromosome stability and methionine prototrophy. *Cell*. 61:437-46.
- Caldwell, J.E., J.A. Waddle, J.A. Cooper, J.A. Hollands, S.J. Casella, and J.F. Casella. 1989. cDNAs encoding the beta subunit of cap Z, the actin-capping protein of the Z line of muscle. *J Biol Chem*. 264:12648-52.
- Carazo-Salas, R. 2001. Ran ou le parfum de la chromatine. *Médecine Sciences*. 17:1056-1060.
- Carazo-Salas, R., and S. Brunet. 2002. Assemblage du fuseau de division: le secret des chromosomes. *Médecine Sciences*. 18:1219-1226.
- Carazo-Salas, R.E., G. Guarguaglini, O.J. Gruss, A. Segref, E. Karsenti, and I.W. Mattaj. 1999. Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature*. 400:178-81.
- Carminati, J.L., and T. Stearns. 1997. Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol*. 138:629-641.
- Casella, J.F., S.J. Casella, J.A. Hollands, J.E. Caldwell, and J.A. Cooper. 1989. Isolation and characterization of cDNA encoding the alpha subunit of Cap Z(36/32), an actin-capping protein from the Z line of skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:5800-4.
- Cassimeris, L., D. Gard, P. Tran, and H. Erickson. 2001. XMAP215 is a long thin molecule that does not increase microtubule stiffness. *J Cell Sci*. 114:3025-3033.
- Castrillon, D.H., and S.A. Wasserman. 1994. Diaphanous is required for cytokinesis in Drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development*. 120:3367-77.
- Chan, G.K., S.A. Jablonski, D.A. Starr, M.L. Goldberg, and T.J. Yen. 2000. Human Zw10 and ROD are mitotic checkpoint proteins that bind to kinetochores. *Nat Cell Biol*. 2:944-7.
- Cheeseman, I.M., D.G. Drubin, and G. Barnes. 2002. Simple centromere, complex kinetochore: linking spindle microtubules and centromeric DNA in budding yeast. *J. Cell Biol*. 157:199-203.
- Cheeseman, I.M., M. Enquist-Newman, T. Muller-Reichert, D.G. Drubin, and G. Barnes. 2001. Mitotic spindle integrity and kinetochore function linked by the Duo1p/Dam1p complex. *J Cell Biol*. 152:197-212.
- Chen, R.H., A. Shevchenko, M. Mann, and A.W. Murray. 1998. Spindle checkpoint protein Xmad1 recruits Xmad2 to unattached kinetochores. *J Cell Biol*. 143:283-295.
- Chen, R.H., J.C. Waters, E.D. Salmon, and A.W. Murray. 1996. Association of spindle assembly checkpoint component XMAP215 with unattached kinetochores. *Science*. 274:242-246.
- Choi, J.H., N.R. Adames, T.F. Chan, C. Zeng, J.A. Cooper, and X.F. Zheng. 2000. TOR signaling regulates microtubule structure and function. *Curr Biol*. 10:861-864.
- Choi, J.H., P.G. Bertram, R. Drenan, J. Carvalho, H.H. Zhou, and X.F.S. Zheng. 2002. The FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) is a CLIP-170 kinase. *EMBO Reports*:kvf197.
- Chretien, D., S.D. Fuller, and E. Karsenti. 1995. Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates. *J Cell Biol*. 129:1311-28.
- Chuang, J.Z., T.A. Milner, and C.H. Sung. 2001. Subunit heterogeneity of cytoplasmic dynein: Differential expression of 14 kDa dynein light chains in rat hippocampus. *J Neurosci*. 21:5501-12.
- Clark, S.W., and D.I. Meyer. 1992. Centractin is an actin homologue associated with the centrosome. *Nature*. 359:246-250.

- Clarke, L., and J. Carbon. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature*. 287:504-9.
- Cleveland, D.W., Y. Mao, and K.F. Sullivan. 2003. Centromeres and kinetochores. From epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell*. 112:407-21.
- Collins, C.A., and R.B. Vallee. 1989. Preparation of microtubules from rat liver and testis: cytoplasmic dynein is a major microtubule associated protein. *Cell Motil Cytoskeleton*. 14:491-500.
- Compton, D.A., and D.W. Cleveland. 1994. NuMA, a nuclear protein involved in mitosis and nuclear reformation. *Curr Opin Cell Biol*. 6:343-346.
- Cook, T.A., T. Nagasaki, and G.G. Gundersen. 1998. Rho guanosine triphosphatase mediates the selective stabilization of microtubules induced by lysophosphatidic acid. *J Cell Biol*. 141:175-185.
- Coquelle, F.M., M. Caspi, F.P. Cordelieres, J.P. Dompierre, D.L. Dujardin, C. Koifman, P. Martin, C.C. Hoogenraad, A. Akhmanova, N. Galjart, J.R. De Mey, and O. Reiner. 2002. LIS1, CLIP-170's Key to the Dynein/Dynactin Pathway. *Mol. Cell. Biol*. 22:3089-3102.
- Cramer, L.P., M. Siebert, and T.J. Mitchison. 1997. Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: implications for the generation of motile force. *J Cell Biol*. 136:1287-305.
- Daniolos, A., A.B. Lerner, and M.R. Lerner. 1990. Action of light on frog pigment cells in culture. *Pigment Cell Res*. 3:38-43.
- David-Pfeuty, T., H.P. Erickson, and D. Pantaloni. 1977. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5372-6.
- David-Pfeuty, T., J. Laporte, and D. Pantaloni. 1978. GTPase activity at ends of microtubules. *Nature*. 272:282-4.
- De Mey, J.R., I.U. Wacker, D. Hennig, and J. Rickard. 1995. CLIP-170 becomes associated with the corona of unattached kinetochores, but is released, together with the corona, upon the establishment of kinetochore fibers. In Chromosome segregation and aneuploidy. B.K.V. A. Abbondandolo, R. Roi, editor, Sorrento, Italy. 63-75.
- de Rocquigny, H., P. Petitjean, V. Tanchou, D. Decimo, L. Drouot, T. Delaunay, J.L. Darlix, and B.P. Roques. 1997. The zinc fingers of HIV nucleocapsid protein NCp7 direct interactions with the viral regulatory protein Vpr. *J Biol Chem*. 272:30753-30759.
- De Zeeuw, C.I., E.L. Hertzberg, and E. Mugnaini. 1995. The dendritic lamellar body: a new neuronal organelle putatively associated with dendrodendritic gap junctions. *J Neurosci*. 15:1587-604.
- De Zeeuw, C.I., C.C. Hoogenraad, E. Goedknecht, E. Hertzberg, A. Neubauer, F. Grosveld, and N. Galjart. 1997. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron*. 19:1187-1199.
- Deacon, S.W., A.S. Serpinskaya, P.S. Vaughan, M.L. Fanarraga, I. Vernos, K.T. Vaughan, and V.I. Gelfand. 2003. Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J. Cell Biol.*:jcb.200210066.
- Delabie, J., G. Bilbe, J. Bruggen, F. Van Leuven, and C. De Wolf-Peeters. 1993. Restin in Hodgkin's disease and anaplastic large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 12:21-6.
- Delabie, J., R. Shipman, J. Bruggen, B. De Strooper, F. van Leuven, L. Tarcsay, N. Cerletti, K. Odink, V. Diehl, G. Bilbe, and et al. 1992. Expression of the novel intermediate filament-associated protein restin in Hodgkin's disease and anaplastic large-cell lymphoma. *Blood*. 80:2891-6.
- Desai, A., S. Verma, T.J. Mitchison, and C.E. Walczak. 1999. Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes. *Cell*. 96:69-78.
- Diamantopoulos, G.S., F. Perez, H.V. Goodson, G. Batelier, R. Meiki, T.E. Kreis, and J.E. Rickard. 1999. Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *Journal of cell biology*. 144:99-112.
- DiBella, L.M., S.E. Benashski, H.W. Tedford, A. Harrison, R.S. Patel-King, and S.M. King. 2001. The Tctex1/Tctex2 Class of Dynein Light Chains. DIMERIZATION, DIFFERENTIAL EXPRESSION, AND INTERACTION WITH THE LC8 PROTEIN FAMILY. *J. Biol. Chem*. 276:14366-14373.

- Dick, T., K. Ray, H.K. Salz, and W. Chia. 1996. Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol.* 16:1966-77.
- Dillman, J.F., 3rd, and K.K. Pfister. 1994. Differential phosphorylation in vivo of cytoplasmic dynein associated with anterogradely moving organelles. *J Cell Biol.* 127:1671-81.
- Doheny, K.F., P.K. Sorger, A.A. Hyman, S. Tugendreich, F. Spencer, and P. Hieter. 1993. Identification of essential components of the *S. cerevisiae* kinetochore. *Cell.* 73:761-74.
- Dujardin, D., U.I. Wacker, A. Moreau, T.A. Schroer, J.E. Rickard, and J.R. De Mey. 1998. Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol.* 141:849-862.
- Dujardin, D.L., and R.B. Vallee. 2002. Dynein at the cortex. *Curr Opin Cell Biol.* 14:44-49.
- Echeverri, C.J., B.M. Paschal, K.T. Vaughan, and R.B. Vallee. 1996. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J Cell Biol.* 132:617-633.
- Eckley, D.M., S.R. Gill, K.A. Melkonian, J.B. Bingham, H.V. Goodson, J.E. Heuser, and T.A. Schroer. 1999. Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the arp1 minifilament pointed end. *J Cell Biol.* 147:307-320.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411:494-498.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15:188-200.
- Eshel, D., L.A. Urrestarazu, S. Vissers, J.C. Jauniaux, J.C. van Vliet-Reedijk, R.J. Planta, and I.R. Gibbons. 1993. Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:11172-11176.
- Espreafico, E., R. Cheney, M. Matteoli, A. Nascimento, P. De Camilli, R. Larson, and M. Mooseker. 1992. Primary structure and cellular localization of chicken brain myosin-V (p190), an unconventional myosin with calmodulin light chains. *J. Cell Biol.* 119:1541-1557.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2001. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC $\zeta$ . *Cell.* 106:489-498.
- Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2003. Cell polarity: Par6, aPKC and cytoskeletal crosstalk. *Current Opinion in Cell Biology.* 15:67-72.
- Fang, G., H. Yu, and M.W. Kirschner. 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.* 12:1871-83.
- Farkasovsky, M., and H. Kuntzel. 1995. Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions. *J Cell Biol.* 131:1003-1014.
- Farkasovsky, M., and H. Kuntzel. 2001. Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J Cell Biol.* 152:251-262.
- Faulkner, N.E., D.L. Dujardin, C.Y. Tai, K.T. Vaughan, C.B. O'Connell, Y. Wang, and R.B. Vallee. 2000. A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol.* 2:784-791.
- Fearnhead, N.S., M.P. Britton, and W.F. Bodmer. 2001. The ABC of APC. *Hum Mol Genet.* 10:721-733.
- Fitzgerald-Hayes, M., L. Clarke, and J. Carbon. 1982. Nucleotide sequence comparisons and functional analysis of yeast centromere DNAs. *Cell.* 29:235-44.
- Flyvbjerg, H., E. Jobs, and S. Leibler. 1996. Kinetics of self-assembling microtubules: an "inverse problem" in biochemistry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:5975-9.
- Fodde, R., J. Kuipers, C. Rosenberg, R. Smits, M. Kielman, C. Gaspar, J.H. van Es, C. Breukel, J. Wiegant, R.H. Giles, and H. Clevers. 2001. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol.* 3:433-438.



- Friederich, E., K. Vancompernelle, C. Huet, M. Goethals, J. Finidori, J. Vandekerckhove, and D. Louvard. 1992. An actin-binding site containing a conserved motif of charged amino acid residues is essential for the morphogenic effect of villin. *Cell*. 70:81-92.
- Fukata, M., T. Watanabe, J. Noritake, M. Nakagawa, M. Yamaga, S. Kuroda, Y. Matsuura, A. Iwamatsu, F. Perez, and K. Kaibuchi. 2002. Rac1 and Cdc42 Capture Microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell*. 109:873-885.
- Funabiki, H., and A.W. Murray. 2000. The *Xenopus* chromokinesin Xkid is essential for metaphase chromosome alignment and must be degraded to allow anaphase chromosome movement. *Cell*. 102:411-424.
- Gaglio, T., M.A. Dionne, and D.A. Compton. 1997. Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J Cell Biol*. 138:1055-1066.
- Gaglio, T., A. Saredi, J.B. Bingham, M.J. Hasbani, S.R. Gill, T.A. Schroer, and D.A. Compton. 1996. Opposing motor activities are required for the organization of the mammalian mitotic spindle pole. *J Cell Biol*. 135:399-414.
- Galjart, N., and F. Perez. 2003. A plus-end raft to control microtubule dynamics and function. *Current Opinion in Cell Biology*. 15:48-53.
- Garces, J.A., I.B. Clark, D.I. Meyer, and R.B. Vallee. 1999. Interaction of the p62 subunit of dynactin with Arp1 and the cortical actin cytoskeleton. *Curr Biol*. 9:1497-1500.
- Gard, D.L., and M.W. Kirschner. 1987. Microtubule assembly in cytoplasmic extracts of *Xenopus* oocytes and eggs. *J Cell Biol*. 105:2191-201.
- Gee, M.A., J.E. Heuser, and R.B. Vallee. 1997. An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature*. 390:636-639.
- Geiser, J.R., E.J. Schott, T.J. Kingsbury, N.B. Cole, L.J. Totis, G. Bhattacharyya, L. He, and M.A. Hoyt. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* genes required in the absence of the CIN8- encoded spindle motor act in functionally diverse mitotic pathways. *Mol Biol Cell*. 8:1035-1050.
- Gibbons, I.R., A. Lee-Eiford, G. Mocz, C.A. Phillipson, W.J. Tang, and B.H. Gibbons. 1987. Photosensitized cleavage of dynein heavy chains. Cleavage at the "V1 site" by irradiation at 365 nm in the presence of ATP and vanadate. *J Biol Chem*. 262:2780-2786.
- Gibbons, I.R., and A. Rowe. 1965. Dynein: a protein with adenosine triphosphate activity from cilia. *Science*. 149:424.
- Gill, S.R., D.W. Cleveland, and T.A. Schroer. 1994. Characterization of DLC-A and DLC-B, two families of cytoplasmic dynein light chain subunits. *Mol Biol Cell*. 5:645-54.
- Gill, S.R., T.A. Schroer, I. Szilak, E.R. Steuer, M.P. Sheetz, and D.W. Cleveland. 1991. Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol*. 115:1639-1650.
- Gorbsky, G.J., R.H. Chen, and A.W. Murray. 1998. Microinjection of antibody to Mad2 protein into mammalian cells in mitosis induces premature anaphase. *J Cell Biol*. 141:1193-1205.
- Gorlich, D., and U. Kutay. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:607-60.
- Goshima, G., and M. Yanagida. 2000. Establishing biorientation occurs with precocious separation of the sister kinetochores, but not the arms, in the early spindle of budding yeast. *Cell*. 100:619-33.
- Gotlieb, A.I., L.M. May, L. Subrahmanyam, and V.I. Kalnins. 1981. Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. *J Cell Biol*. 91:589-94.
- Green, L.M., and J.M. Berg. 1990. Retroviral nucleocapsid protein-metal ion interactions: folding and sequence variants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:6403-7.
- Griffith, K.J., J.P. Ryan, J.L. Senecal, and M.J. Fritzler. 2002. The cytoplasmic linker protein CLIP-170 is a human autoantigen. *Clin Exp Immunol*. 127:533-538.
- Griparic, L., and T.C. Keller, 3rd. 1999. Differential usage of two 5' splice sites in a complex exon generates additional protein sequence complexity in chicken CLIP-170 isoforms. *Biochim Biophys Acta*. 1449:119-124.

- Griparic, L., and T.C.S. Keller, 3rd. 1998. Identification and expression of two novel CLIP-170/Restin isoforms expressed predominantly in muscle. *Biochim Biophys Acta*. 1405:35-46.
- Griparic, L., J.M. Volosky, and T.C. Keller, 3rd. 1998. Cloning and expression of chicken CLIP-170 and restin isoforms. *Gene*. 206:195-208.
- Gruenberg, J., G. Griffiths, and K.E. Howell. 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. *J Cell Biol*. 108:1301-16.
- Gruss, O.J., R.E. Carazo-Salas, C.A. Schatz, G. Guarguaglini, J. Kast, M. Wilm, N. Le Bot, I. Vernos, E. Karsenti, and I.W. Mattaj. 2001. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*. 104:83-93.
- Gruss, O.J., M. Wittmann, H. Yokoyama, R. Pepperkok, T. Kufer, H. Sillje, E. Karsenti, I.W. Mattaj, and I. Vernos. 2002. Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat Cell Biol*. 4:871-9.
- Gundersen, G.G. 2002a. Evolutionary conservation of microtubule-capture mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:296-304.
- Gundersen, G.G. 2002b. Microtubule Capture: IQGAP and CLIP-170 Expand the Repertoire. *Current Biology*. 12:R645-R647.
- Gundersen, G.G., and J.C. Bulinski. 1988. Selective stabilization of microtubules oriented toward the direction of cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:5946-50.
- Gundersen, G.G., I. Kim, and C.J. Chapin. 1994. Induction of stable microtubules in 3T3 fibroblasts by TGF-beta and serum. *J Cell Sci*. 107 ( Pt 3):645-59.
- Gupta, A., L.H. Tsai, and A. Wynshaw-Boris. 2002. Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Rev Genet*. 3:342-355.
- Habura, A., I. Tikhonenko, R.L. Chisholm, and M.P. Koonce. 1999. Interaction mapping of a dynein heavy chain. Identification of dimerization and intermediate-chain binding domains. *J Biol Chem*. 274:15447-53.
- Hamasaki, T., K. Barkalow, J. Richmond, and P. Satir. 1991. cAMP-Stimulated Phosphorylation of an Axonemal Polypeptide That Copurifies with the 22S Dynein Arm Regulates Microtubule Translocation Velocity and Swimming Speed in Paramecium. *PNAS*. 88:7918-7922.
- Han, G., B. Liu, J. Zhang, W. Zuo, N.R. Morris, and X. Xiang. 2001. The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr Biol*. 11:719-724.
- Hannon, G.J. 2002. RNA interference. *Nature*. 418:244-251.
- Harada, A., Y. Takei, Y. Kanai, Y. Tanaka, S. Nonaka, and N. Hirokawa. 1998. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol*. 141:51-59.
- Hart, M.J., M.G. Callow, B. Souza, and P. Polakis. 1996. IQGAP1, a calmodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *Embo J*. 15:2997-3005.
- He, D., C. Zeng, K. Woods, L. Zhong, D. Turner, R.K. Busch, B.R. Brinkley, and H. Busch. 1998. CENP-G: a new centromeric protein that is associated with the alpha-1 satellite DNA subfamily. *Chromosoma*. 107:189-97.
- Heald, R., R. Tournebize, T. Blank, R. Sandaltzopoulos, P. Becker, A. Hyman, and E. Karsenti. 1996. Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature*. 382:420-5.
- Heil-Chapdelaine, R.A., N.R. Adames, and J.A. Cooper. 1999. Formin' the connection between microtubules and the cell cortex. *J Cell Biol*. 144:809-811.
- Heil-Chapdelaine, R.A., J.R. Oberle, and J.A. Cooper. 2000. The cortical protein Num1p is essential for dynein-dependent interactions of microtubules with the cortex. *J Cell Biol*. 151:1337-1344.
- Hetzer, M., D. Bilbao-Cortes, T.C. Walther, O.J. Gruss, and I.W. Mattaj. 2000. GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly. *Mol Cell*. 5:1013-24.
- Hieter, P., D. Pridmore, J.H. Hegemann, M. Thomas, R.W. Davis, and P. Philippsen. 1985. Functional selection and analysis of yeast centromeric DNA. *Cell*. 42:913-21.

- Hoffman, D.B., C.G. Pearson, T.J. Yen, B.J. Howell, and E.D. Salmon. 2001. Microtubule-dependent changes in assembly of microtubule motor proteins and mitotic spindle checkpoint proteins at ptk1 kinetochores. *Mol Biol Cell*. 12:1995-2009.
- Hoffmann, B., W. Zuo, A. Liu, and N.R. Morris. 2001. The LIS1-related protein NUDF of *Aspergillus nidulans* and its interaction partner NUDE bind directly to specific subunits of dynein and dynactin and to alpha- and gamma-tubulin. *J Biol Chem*. 276:38877-38884.
- Holleran, E.A., S. Karki, and E.L.F. Holzbaur. 1998. The role of the dynactin complex in intracellular motility. *International Review of Cytology*. 182:69-109.
- Holleran, E.A., L.A. Ligon, M. Tokito, M.C. Stankewich, J.S. Morrow, and E.L. Holzbaur. 2001. beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin. *J Biol Chem*. 276:36598-36605.
- Holleran, E.A., M.K. Tokito, S. Karki, and E.L. Holzbaur. 1996. Centractin (ARP1) associates with spectrin revealing a potential mechanism to link dynactin to intracellular organelles. *J Cell Biol*. 135:1815-1829.
- Holzbaur, E.L., J.A. Hammarback, B.M. Paschal, N.G. Kravit, K.K. Pfister, and R.B. Vallee. 1991. Homology of a 150K cytoplasmic dynein-associated polypeptide with the *Drosophila* gene Glued. *Nature*. 351:579-583.
- Holzbaur, E.L., and M.K. Tokito. 1996. Localization of the DCTN1 gene encoding p150Glued to human chromosome 2p13 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics*. 31:398-399.
- Holzbaur, E.L., and R.B. Vallee. 1994. DYNEINS: molecular structure and cellular function. *Annu Rev Cell Biol*. 10:339-372.
- Hoogenraad, C.C., A. Akhmanova, F. Grosveld, C.I. De Zeeuw, and N. Galjart. 2000. Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *J Cell Sci*. 113:2285-2297.
- Hoogenraad, C.C., B.H.J. Eussen, A. Langeveld, R. van Haperen, S. Winterberg, C.H. Wouters, F. Grosveld, C.I. De Zeeuw, and N. Galjart. 1998. The murine CYLN2 gene: genomic organization, chromosome localization, and comparison to the human gene that is located within the 7q11.23 williams syndrome critical region [In Process Citation]. *Genomics*. 53:348-358.
- Hoogenraad, C.C., B. Koekkoek, A. Akhmanova, H. Krugers, B. Dortland, M. Miedema, A. Van Alphen, W.M. Kistler, M. Jaegle, M. Koutsourakis, N. Van Camp, M. Verhoye, A. Van Der Linden, I. Kaverina, F. Grosveld, C.I. De Zeeuw, and N. Galjart. 2002. Targeted mutation of Cyln2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nat Genet*. 32:116-127.
- Houchmandzadeh, B., J.F. Marko, D. Chatenay, and A. Libchaber. 1997. Elasticity and structure of eukaryote chromosomes studied by micromanipulation and micropipette aspiration. *J Cell Biol*. 139:1-12.
- Howell, B.J., D.B. Hoffman, G. Fang, A.W. Murray, and E.D. Salmon. 2000. Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *J Cell Biol*. 150:1233-1250.
- Howell, B.J., B.F. McEwen, J.C. Canman, D.B. Hoffman, E.M. Farrar, C.L. Rieder, and E.D. Salmon. 2001. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol*. 155:1159-1172.
- Howman, E.V., K.J. Fowler, A.J. Newson, S. Redward, A.C. MacDonald, P. Kalitsis, and K.H. Choo. 2000. Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:1148-53.
- Hoyt, M.A., L. Totis, and B.T. Roberts. 1991. *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*. 66:507-17.
- Hughes, S.M., K.T. Vaughan, J.S. Herskovits, and R.B. Vallee. 1995. Molecular analysis of a cytoplasmic dynein light intermediate chain reveals homology to a family of ATPases. *J Cell Sci*. 108:17-24.
- Huw, L.Y., A.S. Goldsborough, K. Willison, and K. Artzt. 1995. Tctex2: a sperm tail surface protein mapping to the t-complex. *Dev Biol*. 170:183-94.
- Hyman, A.A., D. Chretien, I. Arnal, and R.H. Wade. 1995. Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphate. *J Cell Biol*. 128:117-25.

- Hyman, A.A., and E. Karsenti. 1996. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell*. 84:401-10.
- Hyman, A.A., and T.J. Mitchison. 1991. Two different microtubule-based motor activities with opposite polarities in kinetochores. *Nature*. 351:206-211.
- Hyman, A.A., S. Salser, D.N. Drechsel, N. Unwin, and T.J. Mitchison. 1992. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Mol Biol Cell*. 3:1155-67.
- Infante, A.S., M.S. Stein, Y. Zhai, G.G. Borisy, and G.G. Gundersen. 2000. Detyrosinated (Glu) microtubules are stabilized by an ATP-sensitive plus-end cap. *J Cell Sci*. 113 ( Pt 22):3907-3919.
- Inoue, S., and E.D. Salmon. 1995. Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol Biol Cell*. 6:1619-40.
- Inoue, Y.H., M. do Carmo Avides, M. Shiraki, P. Deak, M. Yamaguchi, Y. Nishimoto, A. Matsukage, and D.M. Glover. 2000. Orbit, a novel microtubule-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol*. 149:153-166.
- Jackson, M.S., P. Slijepcevic, and B.A. Ponder. 1993. The organisation of repetitive sequences in the pericentromeric region of human chromosome 10. *Nucleic Acids Res*. 21:5865-74.
- Jaffrey, S.R., and S.H. Snyder. 1996. PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science*. 274:774-7.
- Janke, C., J. Ortiz, T.U. Tanaka, J. Lechner, and E. Schiebel. 2002. Four new subunits of the Dam1-Duo1 complex reveal novel functions in sister kinetochore biorientation. *EMBO J*. 21:181-193.
- Jannatipour, M., and L.A. Rokeach. 1998. A *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a novel polypeptide with a predicted alpha-helical rod structure found in the myosin and intermediate-filament families of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1399:67-72.
- Jimbo, T., Y. Kawasaki, R. Koyama, R. Sato, S. Takada, K. Haraguchi, and T. Akiyama. 2002. Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nat Cell Biol*. 4:323-327.
- Johnsingh, A.A., J.M. Johnston, G. Merz, J. Xu, L. Kotula, J.S. Jacobsen, and N. Tezapsidis. 2000. Altered binding of mutated presenilin with cytoskeleton-interacting proteins. *FEBS Lett*. 465:53-58.
- Juwana, J.P., P. Henderikx, A. Mischo, A. Wadle, N. Fadle, K. Gerlach, J.W. Arends, H. Hoogenboom, M. Pfreundschuh, and C. Renner. 1999. EB/RP gene family encodes tubulin binding proteins. *Int J Cancer*. 81:275-84.
- Kahana, J.A., and D.W. Cleveland. 1999. Beyond nuclear transport. Ran-GTP as a determinant of spindle assembly. *J Cell Biol*. 146:1205-10.
- Kahana, J.A., G. Schlenstedt, D.M. Evanchuk, J.R. Geiser, M.A. Hoyt, and P.A. Silver. 1998. The yeast dynactin complex is involved in partitioning the mitotic spindle between mother and daughter cells during anaphase B. *Mol Biol Cell*. 9:1741-1756.
- Kai, N., M. Mishina, and T. Yagi. 1997. Molecular cloning of Fyn-associated molecules in the mouse central nervous system. *J Neurosci Res*. 48:407-24.
- Kaibuchi, K. 1999. Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by Rho targets. *Prog Mol Subcell Biol*. 22:23-38.
- Kaplan, K.B., A.A. Burds, J.R. Swedlow, S.S. Bekir, P.K. Sorger, and I.S. Nathke. 2001. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol*. 3:429-432.
- Kapoor, T.M., T.U. Mayer, M.L. Coughlin, and T.J. Mitchison. 2000. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol*. 150:975-988.
- Kapoor, T.M., and T.J. Mitchison. 2001. Eg5 is static in bipolar spindles relative to tubulin: evidence for a static spindle matrix. *J. Cell Biol*. 154:1125-1134.
- Karki, S., and E.L. Holzbaur. 1995. Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. *J Biol Chem*. 270:28806-28811.
- Karki, S., M.K. Tokito, and E.L. Holzbaur. 1997. Casein kinase II binds to and phosphorylates cytoplasmic dynein. *J Biol Chem*. 272:5887-91.

- Karsenti, E., and I. Vernos. 2001. The mitotic spindle: a self-made machine. *Science*. 294:543-547.
- Kawasaki, Y., T. Senda, T. Ishidate, R. Koyama, T. Morishita, Y. Iwayama, O. Higuchi, and T. Akiyama. 2000. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science*. 289:1194-7.
- Khodjakov, A., R.W. Cole, B.F. McEwen, K.F. Buttle, and C.L. Rieder. 1997. Chromosome fragments possessing only one kinetochore can congress to the spindle equator. *J Cell Biol*. 136:229-240.
- Khodjakov, A., R.W. Cole, B.R. Oakley, and C.L. Rieder. 2000. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol*. 10:59-67.
- Khodjakov, A., L. Copenagle, M.B. Gordon, D.A. Compton, and T.M. Kapoor. 2003. Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis. *J. Cell Biol.*:jcb.200208143.
- King, S., and R. Patel-King. 1995. The M(r) = 8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from *Chlamydomonas* flagella have cytoplasmic homologues. *J. Biol. Chem*. 270:11445-11452.
- King, S.J., and T.A. Schroer. 2000. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol*. 2:20-24.
- King, S.M. 2000a. AAA domains and organization of the dynein motor unit. *J Cell Sci*. 113:2521-2526.
- King, S.M. 2000b. The dynein microtubule motor. *Biochim Biophys Acta*. 1496:60-75.
- King, S.M., E. Barbarese, J.F. Dillman, 3rd, S.E. Benashski, K.T. Do, R.S. Patel-King, and K.K. Pfister. 1998. Cytoplasmic dynein contains a family of differentially expressed light chains. *Biochemistry*. 37:15033-41.
- King, S.M., E. Barbarese, J.F. Dillman, III, R.S. Patel-King, J.H. Carson, and K.K. Pfister. 1996a. Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000 light chain. *J Biol Chem*. 271:19358-66.
- King, S.M., J.F. Dillman, 3rd, S.E. Benashski, R.J. Lye, R.S. Patel-King, and K.K. Pfister. 1996b. The mouse t-complex-encoded protein Tctex-1 is a light chain of brain cytoplasmic dynein. *J Biol Chem*. 271:32281-7.
- King, S.M., C.G. Wilkerson, and G.B. Witman. 1991. The Mr 78,000 intermediate chain of *Chlamydomonas* outer arm dynein interacts with alpha-tubulin in situ. *J Biol Chem*. 266:8401-8407.
- Kinoshita, K., I. Arnal, A. Desai, D.N. Drechsel, and A.A. Hyman. 2001. Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components. *Science*. 294:1340-3.
- Kinzler, K.W., and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 87:159-70.
- Kitagawa, K., and P. Hieter. 2001. Evolutionary conservation between budding yeast and human kinetochores. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:678-687.
- Komarova, Y.A., A.S. Akhmanova, S.-i. Kojima, N. Galjart, and G.G. Borisy. 2002. Cytoplasmic linker proteins promote microtubule rescue in vivo. *J. Cell Biol*. 159:589-599.
- Koonce, M.P. 1997. Identification of a microtubule-binding domain in a cytoplasmic dynein heavy chain. *J Biol Chem*. 272:19714-8.
- Koonce, M.P., and J.R. McIntosh. 1990. Identification and immunolocalization of cytoplasmic dynein in *Dictyostelium*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 15:51-62.
- Korinek, W.S., M.J. Copeland, A. Chaudhuri, and J. Chant. 2000. Molecular linkage underlying microtubule orientation toward cortical sites in yeast. *Science*. 287:2257-2259.
- Kosco, K.A., C.G. Pearson, P.S. Maddox, P.J. Wang, I.R. Adams, E.D. Salmon, K. Bloom, and T.C. Huffaker. 2001. Control of microtubule dynamics by Stu2p is essential for spindle orientation and metaphase chromosome alignment in yeast. *Mol Biol Cell*. 12:2870-2880.
- Kosik, K.S., L.D. Orecchio, B. Schnapp, H. Inouye, and R.L. Neve. 1990. The primary structure and analysis of the squid kinesin heavy chain. *J Biol Chem*. 265:3278-83.
- Kraynov, V.S., C. Chamberlain, G.M. Bokoch, M.A. Schwartz, S. Slabaugh, and K.M. Hahn. 2000. Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science*. 290:333-7.
- Kurihara, L.J., C.T. Beh, M. Latterich, R. Schekman, and M.D. Rose. 1994. Nuclear congression and membrane fusion: two distinct events in the yeast karyogamy pathway. *J Cell Biol*. 126:911-923.

- Kuroda, S., M. Fukata, K. Kobayashi, M. Nakafuku, N. Nomura, A. Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1996. Identification of IQGAP as a putative target for the small GTPases, Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem.* 271:23363-7.
- Lacey, M.L., and L.T. Haimo. 1992. Cytoplasmic dynein is a vesicle protein. *J Biol Chem.* 267:4793-4798.
- Lambright, D.G., J. Sondek, A. Bohm, N.P. Skiba, H.E. Hamm, and P.B. Sigler. 1996. The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature.* 379:311-9.
- Lantz, V.A., and K.G. Miller. 1998. A class VI unconventional myosin is associated with a homologue of a microtubule-binding protein, cytoplasmic linker protein-170, in neurons and at the posterior pole of *Drosophila* embryos. *J Cell Biol.* 140:897-910.
- Larsson, N., U. Marklund, H.M. Gradin, G. Brattsand, and M. Gullberg. 1997. Control of microtubule dynamics by oncoprotein 18: dissection of the regulatory role of multisite phosphorylation during mitosis. *Mol Cell Biol.* 17:5530-9.
- Lechner, J., and J. Carbon. 1991. A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. *Cell.* 64:717-25.
- Ledbetter, S.A., A. Kuwano, W.B. Dobyns, and D.H. Ledbetter. 1992. Microdeletions of chromosome 17p13 as a cause of isolated lissencephaly. *Am J Hum Genet.* 50:182-9.
- Lee, L., J.S. Tirnauer, J. Li, S.C. Schuyler, J.Y. Liu, and D. Pellman. 2000. Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science.* 287:2260-2262.
- Lee, W.-L., J.R. Oberle, and J.A. Cooper. 2003. The role of the lissencephaly protein Pac1 during nuclear migration in budding yeast. *J. Cell Biol.* 160:355-364.
- Lees-Miller, J.P., D.M. Helfman, and T.A. Schroer. 1992. A vertebrate actin-related protein is a component of a multisubunit complex involved in microtubule-based vesicle motility. *Nature.* 359:244-246.
- Lemos, C.L., P. Sampaio, H. Maiato, M. Costa, L.V. Omel'yanchuk, V. Liberal, and C.E. Sunkel. 2000. Mast, a conserved microtubule-associated protein required for bipolar mitotic spindle organization. *Embo J.* 19:3668-3682.
- Lewis, S.A., G. Tian, and N.J. Cowan. 1997. The alpha- and beta-tubulin folding pathways. *Trends in Cell Biology.* 7:479-484.
- Li, R., and A.W. Murray. 1991. Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell.* 66:519-31.
- Li, S., J. Finley, Z.-J. Liu, S.-H. Qiu, H. Chen, C.-H. Luan, M. Carson, J. Tsao, D. Johnson, G. Lin, J. Zhao, W. Thomas, L.A. Nagy, B. Sha, L.J. DeLucas, B.-C. Wang, and M. Luo. 2002. Crystal structure of the cytoskeleton-associated protein (CAP-Gly) domain. *J. Biol. Chem.*:M208512200.
- Li, X., and R.B. Nicklas. 1995. Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature.* 373:630-632.
- Li, Y.Y., E. Yeh, T. Hays, and K. Bloom. 1993. Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10096-10100.
- Liao, G., and G.G. Gundersen. 1998. Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. *J Biol Chem.* 273:9797-803.
- Ligon, L.A., S. Karki, M. Tokito, and E.L. Holzbaun. 2001. Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol.* 3:913-917.
- Lin, H., P. de Carvalho, D. Kho, C.-Y. Tai, P. Pierre, G.R. Fink, and D. Pellman. 2001. Polyploids require Bik1 for kinetochore-microtubule attachment. *J. Cell Biol.* 155:1173-1184.
- Lin, S.X.H., and C.A. Collins. 1992. Immunolocalization of cytoplasmic dynein to lysosomes in cultured cells. *J Cell Sci.* 101:125-137.
- Lodish, H., D. Baltimore, A. Berk, S. Zipursky, P. Matsudaira, and J. Darnell. 1995. Molecular cell biology, 3rd ed.
- Lombillo, V.A., C. Nislow, T.J. Yen, V.I. Gelfand, and J.R. McIntosh. 1995. Antibodies to the kinesin motor domain and CENP-E inhibit microtubule depolymerization-dependent motion of chromosomes in vitro. *J Cell Biol.* 128:107-15.
- Lupas, A. 1996. Coiled coils: new structures and new functions. *Trends Biochem Sci.* 21:375-82.

- Lye, R.J., M.E. Porter, J.M. Scholey, and J.R. McIntosh. 1987. Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. *Cell*. 51:309-18.
- Maddox, P.S., K.S. Bloom, and E.D. Salmon. 2000. The polarity and dynamics of microtubule assembly in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol*. 2:36-41.
- Mandelkow, E.M., E. Mandelkow, and R.A. Milligan. 1991. Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol*. 114:977-91.
- Maney, T., A.W. Hunter, M. Wagenbach, and L. Wordeman. 1998. Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J Cell Biol*. 142:787-801.
- Margolis, R.L., and L. Wilson. 1978. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell*. 13:1-8.
- Margolis, R.L., and L. Wilson. 1981. Microtubule treadmills--possible molecular machinery. *Nature*. 293:705-11.
- Mata, J., and P. Nurse. 1997. *tea1* and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell*. 89:939-49.
- Mattaj, I.W., and L. Englmeier. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem*. 67:265-306.
- McEwen, B.F., G.K. Chan, B. Zubrowski, M.S. Savoian, M.T. Sauer, and T.J. Yen. 2001. CENP-E is essential for reliable bioriented spindle attachment, but chromosome alignment can be achieved via redundant mechanisms in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 12:2776-89.
- McEwen, B.F., A.B. Heagle, G.O. Cassels, K.F. Buttle, and C.L. Rieder. 1997. Kinetochore fiber maturation in PtK1 cells and its implications for the mechanisms of chromosome congression and anaphase onset. *J Cell Biol*. 137:1567-1580.
- McGrail, M., J. Gepner, A. Silvanovich, S. Ludmann, M. Serr, and T.S. Hays. 1995. Regulation of cytoplasmic dynein function in vivo by the *Drosophila* Glued complex. *J Cell Biol*. 131:411-425.
- McIntosh, J.R., E.L. Grishchuk, and R.R. West. 2002. Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 18:193-219.
- McMillan, J.N., and K. Tatchell. 1994. The JNM1 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is required for nuclear migration and spindle orientation during the mitotic cell cycle. *J Cell Biol*. 125:143-158.
- Melki, R., M.F. Carlier, D. Pantaloni, and S.N. Timasheff. 1989. Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies. *Biochemistry*. 28:9143-52.
- Melki, R., I.E. Vainberg, R.L. Chow, and N.J. Cowan. 1993. Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and gamma-tubulin. *J Cell Biol*. 122:1301-10.
- Meluh, P.B., P. Yang, L. Glowczewski, D. Koshland, and M.M. Smith. 1998. Cse4p is a component of the core centromere of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*. 94:607-13.
- Merdes, A., and D.W. Cleveland. 1997. Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components. *J Cell Biol*. 138:953-956.
- Merdes, A., and J. De Mey. 1990. The mechanism of kinetochore-spindle attachment and polewards movement analyzed in PtK2 cells at prophase-prometaphase transition. *European journal of cell biology*. 53:313-325.
- Merdes, A., R. Heald, K. Samejima, W.C. Earnshaw, and D.W. Cleveland. 2000. Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. *J Cell Biol*. 149:851-862.
- Merdes, A., K. Ramyar, J.D. Vechio, and D.W. Cleveland. 1996. A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell*. 87:447-58.
- Meric, C., E. Gouilloud, and P.F. Spahr. 1988. Mutations in Rous sarcoma virus nucleocapsid protein p12 (NC): deletions of Cys-His boxes. *J Virol*. 62:3328-33.
- Michaelson, D., J. Silletti, G. Murphy, P. D'Eustachio, M. Rush, and M.R. Philips. 2001. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J Cell Biol*. 152:111-126.

- Michaely, P., and V. Bennett. 1993. The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. *J Biol Chem.* 268:22703-9.
- Mikami, A., S.H. Tynan, T. Hama, K. Luby-Phelps, T. Saito, J.E. Crandall, J.C. Besharse, and R.B. Vallee. 2002. Molecular structure of cytoplasmic dynein 2 and its distribution in neuronal and ciliated cells. *J Cell Sci.* 115:4801-4808.
- Milisav, I. 1998. Dynein and dynein-related genes. *Cell Motil Cytoskeleton.* 39:261-72.
- Miller, R.K., S.C. Cheng, and M.D. Rose. 2000. Bim1p/Yeb1p mediates the Kar9p-dependent cortical attachment of cytoplasmic microtubules. *Mol Biol Cell.* 11:2949-2959.
- Miller, R.K., D. Matheos, and M.D. Rose. 1999. The cortical localization of the microtubule orientation protein, Kar9p, is dependent upon actin and proteins required for polarization. *J Cell Biol.* 144:963-975.
- Miller, R.K., and M.D. Rose. 1998. Kar9p is a novel cortical protein required for cytoplasmic microtubule orientation in yeast. *J Cell Biol.* 140:377-390.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. 2000a. Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol.* 148:505-518.
- Mimori-Kiyosue, Y., N. Shiina, and S. Tsukita. 2000b. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol.* 10:865-868.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312:237-42.
- Mocz, G., and I.R. Gibbons. 1996. Phase partition analysis of nucleotide binding to axonemal dynein. *Biochemistry.* 35:9204-11.
- Morris, N.R. 2000a. Nuclear migration. From fungi to the mammalian brain. *J Cell Biol.* 148:1097-1101.
- Morris, N.R., V.P. Efimov, and X. Xiang. 1998a. Nuclear migration, nucleokinesis and lissencephaly. *Trends Cell Biol.* 8:467-470.
- Morris, R. 2000b. A rough guide to a smooth brain. *Nat Cell Biol.* 2:E201-E202.
- Morris, S.M., U. Albrecht, O. Reiner, G. Eichele, and L.Y. Yu-Lee. 1998b. The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC. *Curr Biol.* 8:603-606.
- Morrison, E.E., B.N. Wardleworth, J.M. Askham, A.F. Markham, and D.M. Meredith. 1998. EB1, a protein which interacts with the APC tumour suppressor, is associated with the microtubule cytoskeleton throughout the cell cycle. *Oncogene.* 17:3471-3477.
- Muhua, L., T.S. Karpova, and J.A. Cooper. 1994. A yeast actin-related protein homologous to that in vertebrate dynactin complex is important for spindle orientation and nuclear migration. *Cell.* 78:669-679.
- Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:6181-6.
- Mullins, R.D., W.F. Stafford, and T.D. Pollard. 1997. Structure, subunit topology, and actin-binding activity of the Arp2/3 complex from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol.* 136:331-43.
- Musarella, M.A., C.L. Anson-Cartwright, C. McDowell, A.H. Burghes, S.E. Coulson, R.G. Worton, and J.M. Rommens. 1991. Physical mapping at a potential X-linked retinitis pigmentosa locus (RP3) by pulsed-field gel electrophoresis. *Genomics.* 11:263-72.
- Myster, S.H., J.A. Knott, K.M. Wysocki, E. O'Toole, and M.E. Porter. 1999. Domains in the 1alpha dynein heavy chain required for inner arm assembly and flagellar motility in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol.* 146:801-18.
- Nagasaki, T., and G.G. Gundersen. 1996. Depletion of lysophosphatidic acid triggers a loss of oriented detyrosinated microtubules in motile fibroblasts. *J Cell Sci.* 109 ( Pt 10):2461-9.
- Nakamura, M., X.Z. Zhou, and K.P. Lu. 2001. Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr Biol.* 11:1062-1067.
- Nasmyth, K. 1999. Separating sister chromatids. *Trends Biochem Sci.* 24:98-104.



- Nathke, I.S., C.L. Adams, P. Polakis, J.H. Sellin, and W.J. Nelson. 1996. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol.* 134:165-79.
- Neer, E.J., C.J. Schmidt, R. Nambudripad, and T.F. Smith. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature.* 371:297-300.
- Niederstrasser, H., H. Salehi-Had, E.C. Gan, C. Walczak, and E. Nogales. 2002. XKCM1 acts on a single protofilament and requires the C terminus of tubulin. *J Mol Biol.* 316:817-28.
- Niethammer, M., D.S. Smith, R. Ayala, J. Peng, J. Ko, M.S. Lee, M. Morabito, and L.H. Tsai. 2000. NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron.* 28:697-711.
- Nilsson, H., and M. Wallin. 1997. Evidence for several roles of dynein in pigment transport in melanophores. *Cell Motil Cytoskeleton.* 38:397-409.
- Nobes, C.D., and A. Hall. 1999. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol.* 144:1235-44.
- Nogales, E. 2000. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem.* 69:277-302.
- Palazzo, A., J. Hazel, Y. Chen, D. Dujardin, A. Alberts, K. Pfister, R. Vallee, and G. Gundersen. 2001a. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Current Biology.* 11:1536-1541.
- Palazzo, A.F., T.A. Cook, A.S. Alberts, and G.G. Gundersen. 2001b. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol.* 3:723-729.
- Paschal, B.M., E.L. Holzbaur, K.K. Pfister, S. Clark, D.I. Meyer, and R.B. Vallee. 1993. Characterization of a 50-kDa polypeptide in cytoplasmic dynein preparations reveals a complex with p150GLUED and a novel actin. *J Biol Chem.* 268:15318-23.
- Paschal, B.M., A. Mikami, K.K. Pfister, and R.B. Vallee. 1992. Homology of the 74-kD cytoplasmic dynein subunit with a flagellar dynein polypeptide suggests an intracellular targeting function. *Journal of Cell Biology.* 118:1133-1143.
- Paschal, B.M., H.S. Shpetner, and R.B. Vallee. 1987. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *J Cell Biol.* 105:1273-82.
- Paschal, B.M., H.S. Shpetner, and R.B. Vallee. 1991. Purification of brain cytoplasmic dynein and characterization of its in vitro properties. *Methods Enzymol.* 196:181-191.
- Paschal, B.M., and R.B. Vallee. 1987. Retrograde transport by the microtubule-associated protein MAP 1C. *Nature.* 330:181-183.
- Paschal, B.M., and R.B. Vallee. 1993. Microtubule and axoneme gliding assays for force production by microtubule motor proteins. *Methods Cell Biol.* 39:65-74.
- Pazour, G.J., B.L. Dickert, and G.B. Witman. 1999. The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J Cell Biol.* 144:473-81.
- Perez, F., G.S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T.E. Kreis. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell.* 96:517-527.
- Perez, F., K. Pernet-Gallay, C. Nizak, H.V. Goodson, T.E. Kreis, and B. Goud. 2002. CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family. *J. Cell Biol.* 156:631-642.
- Pfarr, C.M., M. Coue, P.M. Grissom, T.S. Hays, M.E. Porter, and J.R. McIntosh. 1990. Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature.* 345:263-265.
- Pfister, K.K., R.B. Fay, and G.B. Witman. 1982. Purification and polypeptide composition of dynein ATPases from *Chlamydomonas* flagella. *Cell Motil.* 2:525-47.
- Pierre, P., R. Pepperkok, and T.E. Kreis. 1994. Molecular characterization of two functional domains of CLIP-170 in vivo. *J Cell Sci.* 107:1909-1920.
- Pierre, P., J. Scheel, J.E. Rickard, and T.E. Kreis. 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell.* 70:887-900.
- Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 29:545-76.

- Porter, M.E., R. Bower, J.A. Knott, P. Byrd, and W. Dentler. 1999. Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Mol Biol Cell*. 10:693-712.
- Putkey, F.R., T. Cramer, M.K. Mophew, A.D. Silk, R.S. Johnson, J.R. McIntosh, and D.W. Cleveland. 2002. Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell*. 3:351-65.
- Quintyne, N.J., S.R. Gill, D.M. Eckley, C.L. Crego, D.A. Compton, and T.A. Schroer. 1999. Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J Cell Biol*. 147:321-334.
- Raff, J.W., K. Jeffers, and J.-y. Huang. 2002. The roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time. *J. Cell Biol*. 157:1139-1149.
- Reiner, O., R. Carozzo, Y. Shen, M. Wehnert, F. Faustinella, W.B. Dobyns, C.T. Caskey, and D.H. Ledbetter. 1993. Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein beta-subunit-like repeats. *Nature*. 364:717-721.
- Ren, X.D., W.B. Kiosses, and M.A. Schwartz. 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *Embo J*. 18:578-85.
- Rickard, J.E., and T.E. Kreis. 1990. Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells. *Journal of cell biology*. 110:1623-1633.
- Rickard, J.E., and T.E. Kreis. 1991. Binding of pp170 to microtubules is regulated by phosphorylation. *J. Biol. Chem*. 266:17597-17605.
- Rickard, J.E., and T.E. Kreis. 1996. CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol*. 6:178-183.
- Rieder, C.L. 1982. The formation, structure, and composition of the mammalian kinetochore and kinetochore fiber. *International review of cytology*. 79:1-58.
- Rieder, C.L., and S.P. Alexander. 1990. Kinetochores are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to the spindle in newt lung cells. *J Cell Biol*. 110:81-95.
- Rieder, C.L., R.W. Cole, A. Khodjakov, and G. Sluder. 1995. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol*. 130:941-948.
- Rieder, C.L., E.A. Davison, L.C. Jensen, L. Cassimeris, and E.D. Salmon. 1986. Oscillatory movements of monooriented chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle. *J Cell Biol*. 103:581-91.
- Rieder, C.L., and E.D. Salmon. 1998. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends Cell Biol*. 8:310-318.
- Rieder, C.L., A. Schultz, R. Cole, and G. Sluder. 1994. Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J Cell Biol*. 127:1301-1310.
- Riehemann, K., and C. Sorg. 1993. Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins. *TIBS*. 18:82-83.
- Rodionov, V.I., and G.G. Borisy. 1997. Microtubule treadmilling in vivo. *Science*. 275:215-8.
- Roux, A.F., J. Rommens, C. McDowell, L. Anson-Cartwright, S. Bell, K. Schappert, G.A. Fishman, and M. Musarella. 1994. Identification of a gene from Xp21 with similarity to the tctex-1 gene of the murine t complex. *Hum Mol Genet*. 3:257-63.
- Roychowdhury, S., and F. Gaskin. 1986. Magnesium requirements for guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) induced assembly of microtubule protein and tubulin. *Biochemistry*. 25:7847-53.
- Rusan, N.M., C.J. Fagerstrom, A.M. Yvon, and P. Wadsworth. 2001. Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell*. 12:971-980.
- Rusan, N.M., U.S. Tulu, C. Fagerstrom, and P. Wadsworth. 2002. Reorganization of the microtubule array in prophase/prometaphase requires cytoplasmic dynein-dependent microtubule transport. *J. Cell Biol*. 158:997-1003.

- Saffery, R., D.V. Irvine, B. Griffiths, P. Kalitsis, L. Wordeman, and K.H. Choo. 2000. Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins. *Hum Mol Genet.* 9:175-185.
- Sahin, U., F. Neumann, O. Tureci, R. Schmits, F. Perez, and M. Pfreundschuh. 2002. Hodgkin and Reed-Sternberg cell-associated autoantigen CLIP-170/restin is a marker for dendritic cells and is involved in the trafficking of macropinosomes to the cytoskeleton, supporting a function-based concept of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood.* 100:4139-4145.
- Salina, D., K. Bodoor, D.M. Eckley, T.A. Schroer, J.B. Rattner, and B. Burke. 2002. Cytoplasmic Dynein as a facilitator of nuclear envelope breakdown. *Cell.* 108:97-107.
- Samsó, M., M. Radermacher, J. Frank, and M.P. Koonce. 1998. Structural characterisation of a dynein motor domain. *Journal of molecular biology.* 276:927-937.
- Sander, E.E., S. van Delft, J.P. ten Klooster, T. Reid, R.A. van der Kammen, F. Michiels, and J.G. Collard. 1998. Matrix-dependent Tiam1/Rac signaling in epithelial cells promotes either cell-cell adhesion or cell migration and is regulated by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Cell Biol.* 143:1385-98.
- Sapir, T., A. Cahana, R. Seger, S. Nekhai, and O. Reiner. 1999a. LIS1 is a microtubule-associated phosphoprotein. *Eur J Biochem.* 265:181-188.
- Sapir, T., M. Eisenstein, H.A. Burgess, D. Horesh, A. Cahana, J. Aoki, M. Hattori, H. Arai, K. Inoue, and O. Reiner. 1999b. Analysis of lissencephaly-causing LIS1 mutations. *Eur J Biochem.* 266:1011-1020.
- Sapir, T., M. Elbaum, and O. Reiner. 1997. Reduction of microtubule catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *Embo J.* 16:6977-6984.
- Saredi, A., L. Howard, and D.A. Compton. 1996. NuMA assembles into an extensive filamentous structure when expressed in the cell cytoplasm. *J Cell Sci.* 109 ( Pt 3):619-30.
- Saredi, A., L. Howard, and D.A. Compton. 1997. Phosphorylation regulates the assembly of NuMA in a mammalian mitotic extract. *J Cell Sci.* 110 ( Pt 11):1287-97.
- Sasaki, S., A. Shionoya, M. Ishida, M.J. Gambello, J. Yingling, A. Wynshaw-Boris, and S. Hirotsune. 2000. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron.* 28:681-696.
- Sawin, K.E. 2000. Microtubule dynamics: the view from the tip. *Curr Biol.* 10:R860-R862.
- Sawin, K.E., K. LeGuellec, M. Philippe, and T.J. Mitchison. 1992. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature.* 359:540-3.
- Scaerou, F., D.A. Starr, F. Piano, O. Papoulas, R.E. Karess, and M.L. Goldberg. 2001. The ZW10 and Rough Deal checkpoint proteins function together in a large, evolutionarily conserved complex targeted to the kinetochore. *J Cell Sci.* 114:3103-3114.
- Schaar, B.T., G.K. Chan, P. Maddox, E.D. Salmon, and T.J. Yen. 1997. CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *J Cell Biol.* 139:1373-1382.
- Schafer, D.A., S.R. Gill, J.A. Cooper, J.E. Heuser, and T.A. Schroer. 1994a. Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *J Cell Biol.* 126:403-412.
- Schafer, D.A., Y.O. Korshunova, T.A. Schroer, and J.A. Cooper. 1994b. Differential localization and sequence analysis of capping protein beta-subunit isoforms of vertebrates. *J Cell Biol.* 127:453-65.
- Scheel, J., P. Pierre, J.E. Rickard, G.S. Diamantopoulos, C. Valetti, F.G. van der Goot, M. Haner, U. Aebi, and T.E. Kreis. 1999. Purification and analysis of authentic CLIP-170 and recombinant fragments. *J Biol Chem.* 274:25883-25891.
- Schnapp, B.J., and T.S. Reese. 1989. Dynein is the motor for retrograde axonal transport of organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:1548-1552.
- Schroer, T. 1996. Structure and function of dynactin. *Seminars in Cell and Dev. Biol.* 7:321-328.
- Schroer, T.A. 2001. Microtubules don and doff their caps: dynamic attachments at plus and minus ends. *Curr Opin Cell Biol.* 13:92-96.

- Schroer, T.A., and M.P. Sheetz. 1991. Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J Cell Biol.* 115:1309-1318.
- Schroer, T.A., E.R. Steuer, and M.P. Sheetz. 1989. Cytoplasmic dynein is a minus-end directed motor for membranous organelles. *Cell.* 56:937-946.
- Schuyler, S.C., and D. Pellman. 2001a. Microtubule "plus-end-tracking proteins". the end is just the beginning. *Cell.* 105:421-424.
- Schuyler, S.C., and D. Pellman. 2001b. Search, capture and signal: games microtubules and centrosomes play. *J Cell Sci.* 114:247-255.
- Schwartz, K., K. Richards, and D. Botstein. 1997. BIM1 Encodes a Microtubule-binding Protein in Yeast. *Mol Biol Cell.* 8:2677-2691.
- Segal, M., and K. Bloom. 2001. Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol.* 11:160-166.
- Sharp, D.J., K.R. Yu, J.C. Sisson, W. Sullivan, and J.M. Scholey. 1999. Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos. *Nat Cell Biol.* 1:51-54.
- Sheeman, B., P. Carvalho, I. Sagot, J. Geiser, D. Kho, M.A. Hoyt, and D. Pellman. 2003. Determinants of *S. cerevisiae* Dynein Localization and Activation. Implications for the Mechanism of Spindle Positioning. *Curr Biol.* 13:364-72.
- Simon, J.R., and E.D. Salmon. 1990. The structure of microtubule ends during the elongation and shortening phases of dynamic instability examined by negative-stain electron microscopy. *J Cell Sci.* 96 ( Pt 4):571-82.
- Small, J.V., K. Rottner, I. Kaverina, and K.I. Anderson. 1998. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta.* 1404:271-81.
- Smith, D.S., M. Niethammer, R. Ayala, Y. Zhou, M.J. Gambello, A. Wynshaw-Boris, and L.H. Tsai. 2000. Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol.* 2:767-775.
- Smith, K.J., D.B. Levy, P. Maupin, T.D. Pollard, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1994. Wild-type but not mutant APC associates with the microtubule cytoskeleton. *Cancer Res.* 54:3672-5.
- Song, Y.H., and E. Mandelkow. 1993. Recombinant kinesin motor domain binds to beta-tubulin and decorates microtubules with a B surface lattice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:1671-5.
- South, T.L., and M.F. Summers. 1993. Zinc- and sequence-dependent binding to nucleic acids by the N-terminal zinc finger of the HIV-1 nucleocapsid protein: NMR structure of the complex with the Psi-site analog, dACGCC. *Protein Sci.* 2:3-19.
- Starr, D.A., B.C. Williams, T.S. Hays, and M.L. Goldberg. 1998. ZW10 helps recruit dynactin and dynein to the kinetochore. *Journal of Cell Biology.* 142:763-774.
- Starr, D.A., B.C. Williams, Z. Li, B. Etemad-Moghadam, R.K. Dawe, and M.L. Goldberg. 1997. Conservation of the centromere/kinetochore protein ZW10. *J Cell Biol.* 138:1289-1301.
- Steffen, W., J.L. Hodgkinson, and G. Wiche. 1996. Immunogold localisation of the intermediate chain within the protein complex of cytoplasmic dynein. *J Struct. Biol.* 117:227-235.
- Steffen, W., S. Karki, K.T. Vaughan, R.B. Vallee, E.L. Holzbaur, D.G. Weiss, and S.A. Kuznetsov. 1997. The involvement of the intermediate chain of cytoplasmic dynein in binding the motor complex to membranous organelles of *Xenopus* oocytes. *Mol Biol Cell.* 8:2077-88.
- Stoler, S., K.C. Keith, K.E. Curnick, and M. Fitzgerald-Hayes. 1995. A mutation in CSE4, an essential gene encoding a novel chromatin-associated protein in yeast, causes chromosome nondisjunction and cell cycle arrest at mitosis. *Genes Dev.* 9:573-86.
- Su, L.K., M. Burrell, D.E. Hill, J. Gyuris, R. Brent, R. Wiltshire, J. Trent, B. Vogelstein, and K.W. Kinzler. 1995. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* 55:2972-2977.
- Sudakin, V., G.K.T. Chan, and T.J. Yen. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* 154:925-936.

- Tai, A.W., J.Z. Chuang, and C.H. Sung. 1998. Localization of Tctex-1, a cytoplasmic dynein light chain, to the Golgi apparatus and evidence for dynein complex heterogeneity. *J Biol Chem.* 273:19639-19649.
- Tai, C.-Y., D.L. Dujardin, N.E. Faulkner, and R.B. Vallee. 2002. Role of dynein, dynactin, and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J. Cell Biol.* 156:959-968.
- Tan, E.M., G.P. Rodnan, I. Garcia, Y. Moroi, M.J. Fritzler, and C. Peebles. 1980. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome. *Arthritis Rheum.* 23:617-25.
- Tarsounas, M., R.E. Pearlman, and P.B. Moens. 2001. Clip-50 immunolocalization during mouse spermiogenesis suggests a role in shaping the sperm nucleus. *Dev Biol.* 236:400-410.
- Tassabehji, M., K. Metcalfe, D. Donnai, J. Hurst, W. Reardon, M. Burch, and A.P. Read. 1997. Elastin: genomic structure and point mutations in patients with supravalvular aortic stenosis. *Hum Mol Genet.* 6:1029-36.
- Taylor, S.S., E. Ha, and F. McKeon. 1998. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol.* 142:1-11.
- 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.* 89:727-735.
- Thiemann, M., M. Schrader, A. Volkl, E. Baumgart, and H.D. Fahimi. 2000. Interaction of peroxisomes with microtubules. In vitro studies using a novel peroxisome-microtubule binding assay. *Eur J Biochem.* 267:6264-6275.
- Thomas, D.B., and C.A. Lingwood. 1975. A model of cell cycle control: effects of thymidine on synchronous cell cultures. *Cell.* 5:37-42.
- Tippit, D.H., J.D. Pickett-Heaps, and R. Leslie. 1980. Cell division in two large pennate diatoms *Hantzschia* and *Nitzschia* III. A new proposal for kinetochore function during prometaphase. *J Cell Biol.* 86:402-16.
- Tirnauer, J.S., and B.E. Bierer. 2000. EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J Cell Biol.* 149:761-766.
- Tirnauer, J.S., J.C. Canman, E.D. Salmon, and T.J. Mitchison. 2002a. EB1 Targets to Kinetochores with Attached, Polymerizing Microtubules. *Mol Biol Cell.* 13:4308-16.
- Tirnauer, J.S., S. Grego, E.D. Salmon, and T.J. Mitchison. 2002b. EB1-microtubule interactions in *Xenopus* egg extracts: role of EB1 in microtubule stabilization and mechanisms of targeting to microtubules. *Mol Biol Cell.* 13:3614-26.
- Tirnauer, J.S., E. O'Toole, L. Berrueta, B.E. Bierer, and D. Pellman. 1999. Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. *J Cell Biol.* 145:993-1007.
- Tokito, M.K., D.S. Howland, V.M. Lee, and E.L. Holzbaur. 1996. Functionally distinct isoforms of dynactin are expressed in human neurons. *Mol Biol Cell.* 7:1167-80.
- Tournebize, R., A. Popov, K. Kinoshita, A.J. Ashford, S. Rybina, A. Pozniakovsky, T.U. Mayer, C.E. Walczak, E. Karsenti, and A.A. Hyman. 2000. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat Cell Biol.* 2:13-9.
- Trueheart, J., J.D. Boeke, and G.R. Fink. 1987. Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol Cell Biol.* 7:2316-28.
- Trzepacz, C., A.M. Lowy, J.J. Kordich, and J. Groden. 1997. Phosphorylation of the tumor suppressor adenomatous polyposis coli (APC) by the cyclin-dependent kinase p34. *J Biol Chem.* 272:21681-21684.
- Tuma, M.C., A. Zill, N. Le Bot, I. Vernos, and V. Gelfand. 1998. Heterotrimeric kinesin II is the microtubule motor protein responsible for pigment dispersion in *Xenopus* melanophores. *J Cell Biol.* 143:1547-58.
- Tyler-Smith, C., G. Gimelli, S. Giglio, G. Florida, A. Pandya, G. Terzoli, P.E. Warburton, W.C. Earnshaw, and O. Zuffardi. 1999. Transmission of a fully functional human neocentromere through three generations. *Am J Hum Genet.* 64:1440-4.
- Tynan, S.H., M.A. Gee, and R.B. Vallee. 2000a. Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding. *J Biol Chem.* 275:32769-74.

- Tynan, S.H., A. Purohit, S.J. Doxsey, and R.B. Vallee. 2000b. Light intermediate chain 1 defines a functional subfraction of cytoplasmic dynein which binds to pericentrin. *J Biol Chem.* 275:32763-8.
- Vaisberg, E.A., P.M. Grissom, and J.R. McIntosh. 1996. Mammalian cells express three distinct dynein heavy chains that are localized to different cytoplasmic organelles. *J Cell Biol.* 133:831-42.
- Vale, R. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell.* 112:467-480.
- Valetti, C., D.M. Wetzel, M. Schrader, M.J. Hasbani, S.R. Gill, T.E. Kreis, and T.A. Schroer. 1999. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamitin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell.* 10:4107-4120.
- Valiron, O., N. Caudron, and D. Job. 2001. Microtubule dynamics. *Cell Mol Life Sci.* 58:2069-2084.
- Vallee, R.B., J.S. Wall, B.M. Paschal, and H.S. Shpetner. 1988. Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. *Nature.* 332:561-563.
- Vasiliev, J.M., I.M. Gelfand, L.V. Domnina, O.Y. Ivanova, S.G. Komm, and L.V. Olshevskaja. 1970. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts. *J Embryol Exp Morphol.* 24:625-40.
- Vasquez, R.J., D.L. Gard, and L. Cassimeris. 1994. XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover. *J Cell Biol.* 127:985-93.
- Vasquez, R.J., D.L. Gard, and L. Cassimeris. 1999. Phosphorylation by CDK1 regulates XMAP215 function in vitro. *Cell Motil Cytoskeleton.* 43:310-21.
- Vaughan, K.T., S.H. Tynan, N.E. Faulkner, C.J. Echeverri, and R.B. Vallee. 1999. Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J. Cell Sci.* 112:1437-1447.
- Vaughan, K.T., and R. Vallee. 1993. Transfection of COS-7 cells with cytoplasmic dynein intermediate chains. *Mol Biol Cell.* 4:162 (Abstr.).
- Vaughan, K.T., and R.B. Vallee. 1995. Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J Cell Biol.* 131:1507-1516.
- Vaughan, P.S., J.D. Leszyk, and K.T. Vaughan. 2001. Cytoplasmic dynein intermediate chain phosphorylation regulates binding to dynactin. *J Biol Chem.* 276:26171-26179.
- Vaughan, P.S., P. Miura, M. Henderson, B. Byrne, and K.T. Vaughan. 2002. A role for regulated binding of p150Glued to microtubule plus ends in organelle transport. *J. Cell Biol.* 158:305-319.
- Verkhovskiy, A.B., T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 1999. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr Biol.* 9:11-20.
- Vernos, I., J. Raats, T. Hirano, J. Heasman, E. Karsenti, and C. Wylie. 1995. Xklp1, a chromosomal *Xenopus* kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosome positioning. *Cell.* 81:117-27.
- Voter, W.A., and H.P. Erickson. 1984. The kinetics of microtubule assembly. Evidence for a two-stage nucleation mechanism. *J Biol Chem.* 259:10430-8.
- Walczak, C.E., T.J. Mitchison, and A. Desai. 1996. XKCM1: a *Xenopus* kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly. *Cell.* 84:37-47.
- Walczak, C.E., I. Vernos, T.J. Mitchison, E. Karsenti, and R. Heald. 1998. A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr Biol.* 8:903-913.
- Wall, M.A., D.E. Coleman, E. Lee, J.A. Iniguez-Lluhi, B.A. Posner, A.G. Gilman, and S.R. Sprang. 1995. The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell.* 83:1047-58.
- Wang, H., and P. Satir. 1998. The 29 kDa light chain that regulates axonemal dynein activity binds to cytoplasmic dyneins. *Cell Motil Cytoskeleton.* 39:1-8.
- Wang, S.Z., and R. Adler. 1995. Chromokinesin: a DNA-binding, kinesin-like nuclear protein. *J Cell Biol.* 128:761-8.
- Wang, Y.L. 1985. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol.* 101:597-602.
- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B.M. Jockusch, and S. Narumiya. 1997. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J.* 16:3044-3056.

- Waterman-Storer, C.M., S. Karki, and E.L. Holzbaur. 1995. The p150Glued component of the dynactin complex binds to both microtubules and the actin-related protein centractin (Arp-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:1634-1638.
- Waterman-Storer, C.M., and E. Salmon. 1999. Positive feedback interactions between microtubule and actin dynamics during cell motility. *Curr Opin Cell Biol.* 11:61-7.
- Waterman-Storer, C.M., R.A. Worthylake, B.P. Liu, K. Burrige, and E.D. Salmon. 1999. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol.* 1:45-50.
- Webster, D.R., J. Wehland, K. Weber, and G.G. Borisy. 1990. Detyrosination of alpha tubulin does not stabilize microtubules in vivo. *J Cell Biol.* 111:113-22.
- Weiss, E., and M. Winey. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J Cell Biol.* 132:111-23.
- White, J., and E. Stelzer. 1999. Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends Cell Biol.* 9:61-65.
- Williams, B.C., T.L. Karr, J.M. Montgomery, and M.L. Goldberg. 1992. The *Drosophila* l(1)zw10 gene product, required for accurate mitotic chromosome segregation, is redistributed at anaphase onset. *J Cell Biol.* 118:759-773.
- Wittmann, T., H. Boleti, C. Antony, E. Karsenti, and I. Vernos. 1998. Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J Cell Biol.* 143:673-85.
- Wittmann, T., and T. Hyman. 1999. Recombinant p50/dynamitin as a tool to examine the role of dynactin in intracellular processes. *Methods in cell biology.* 61:137-143.
- Wittmann, T., and C.M. Waterman-Storer. 2001. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci.* 114:3795-3803.
- Wojcik, E., R. Basto, M. Serr, F. Scaerou, R. Karess, and T. Hays. 2001. Kinetochores dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein. *Nat Cell Biol.* 3:1001-1007.
- Wood, K.W., R. Sakowicz, L.S. Goldstein, and D.W. Cleveland. 1997. CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell.* 91:357-66.
- Wordeman, L., and T.J. Mitchison. 1995. Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis. *J Cell Biol.* 128:95-104.
- Xiang, X., S.M. Beckwith, and N.R. Morris. 1994. Cytoplasmic dynein is involved in nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:2100-2104.
- Xiang, X., G. Han, D.A. Winkelmann, W. Zuo, and N.R. Morris. 2000. Dynamics of cytoplasmic dynein in living cells and the effect of a mutation in the dynactin complex actin-related protein Arp1. *Curr Biol.* 10:603-606.
- Yeh, E., R.V. Skibbens, J.W. Cheng, E.D. Salmon, and K. Bloom. 1995. Spindle dynamics and cell cycle regulation of dynein in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 130:687-700.
- Yin, H., D. Pruyne, T.C. Huffaker, and A. Bretscher. 2000. Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature.* 406:1013-1015.
- Young, A., J.B. Dictenberg, A. Purohit, R. Tuft, and S.J. Doxsey. 2000. Cytoplasmic dynein-mediated assembly of pericentrin and gamma tubulin onto centrosomes. *Mol Biol Cell.* 11:2047-2056.
- Zhai, Y., P.J. Kronebusch, P.M. Simon, and G.G. Borisy. 1996. Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J Cell Biol.* 135:201-214.

## Résumé :

Le terme de CLIP-170 désigne la protéine de lien cytoplasmique de 170 KDa, isolée par Rickard et Kreis (1990). *In vitro*, elle constitue un lien statique entre les endosomes et les microtubules (MTs). En chacun des points où la CLIP-170 est localisée, elle se co-distribue avec le complexe moteur dynéine/dynactine (D/D). Les auteurs ont initialement établi un modèle de fonctionnement de concert de ces trois protagonistes : la CLIP-170 établirait le lien initial entre le cargo et le MT. Le complexe D/D serait recruté sur le cargo. Une fois le moteur associé au MT, le lien statique serait levé, rendant possible le mouvement.

Ce modèle offrait une explication aux données d'immunolocalisation. Toutefois, le fonctionnement de concert de la CLIP-170 et du moteur moléculaire nécessitait que l'on puisse trouver une interaction entre les protagonistes. Les travaux présentés dans cette thèse apportent pour la première fois la preuve d'une interaction indirecte entre le complexe D/D et la CLIP-170. LIS1 est une protéine codée par le gène causal du syndrome de Miller-Dieker, une forme de lissencéphalie de type I. Elle sert d'adaptateur entre le domaine carboxy-terminal de la CLIP-170 et le complexe moteur dont elle régule l'activité.

Nos résultats établissent que le domaine d'interaction de la CLIP-170 avec LIS1 est requis pour l'adressage de la première aux kinétochores prémétaphasiques. Il est nécessaire à l'adressage de LIS1 (et du complexe moteur) aux bouts (+) des MTs interphasiques.

Nous présentons deux nouvelles approches permettant d'interférer avec le fonctionnement de la CLIP-170 tant en interphase qu'en mitose : la microinjection d'anticorps dirigés contre les domaines extrêmes de la protéine, ainsi que l'utilisation de siRNA dirigés contre l'ARNm la codant. Combinées aux techniques de suivi de protéines fluorescentes par vidéomicroscopie 3D développées au laboratoire, elles permettront d'interférer avec le fonctionnement de la CLIP-170 et de définir ainsi son rôle.

**Mots-clés :** CLIP-170, complexe dynéine/dynactine, LIS1, microtubule, kinétochore, +TIPs.