



HAL
open science

Modélisation et analyse d'un interactome de la kinase humaine Aurora A

Olivia Gavard

► **To cite this version:**

Olivia Gavard. Modélisation et analyse d'un interactome de la kinase humaine Aurora A. Bio-informatique [q-bio.QM]. Université de Rennes; Université Laval (Québec, Canada), 2015. Français. NNT : 2015REN1S160 . tel-01674192

HAL Id: tel-01674192

<https://theses.hal.science/tel-01674192>

Submitted on 2 Jan 2018

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

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



UNIVERSITÉ
LAVAL



THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

En Cotutelle Internationale avec
Université Laval, Canada

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie

Ecole doctorale VAS

présentée par

Olivia Gavard

préparée à l'unité de recherche (UMR 6290 IGDR)
Institut de Génétique et Développement de Rennes
Université de Rennes 1

**Modélisation et
analyse d'un
interactome de la
kinase humaine
Aurora A**

**Thèse soutenue à Rennes
le 09 décembre 2015**

devant le jury composé de :

Bernard DUCOMMUN

Professeur - Université de Toulouse *examineur*

Florence GONNET

Professeure - Université d'Évry Val d'Essonne *rapporteur*

Patrick MERALDI

Professeur associé - Université de Genève *rapporteur*

Guy POIRIER

Professeur - Université Laval *co-directeur de thèse*

Arnaud DROIT

Professeur Adjoint - Université Laval *Directeur de thèse*

Claude PRIGENT

Directeur de Recherche UMR6290-IGDR *Directeur de thèse*

Résumé

La kinase Aurora A est une protéine essentielle au cycle cellulaire et plus particulièrement lors de la mitose. En effet, Aurora A est nécessaire dès l'entrée en mitose et régule sa progression. Elle joue un rôle dans la maturation et la séparation des centrosomes. Elle participe à l'assemblage du fuseau mitotique et du fuseau central pour le rassemblement et l'orientation des chromosomes. Enfin elle est nécessaire à la réussite de la cytodierèse. Elle est également nécessaire à l'égale répartition des mitochondries dans les cellules filles et joue un rôle dans l'épissage alternatif des ARNm de facteurs apoptotiques. Au delà de ses fonctions mitotiques, plusieurs études récentes indiquent qu'Aurora A présente des fonctions supplémentaires dans les cellules en interphase. Elle est notamment essentielle au désassemblage du cil primaire et joue un rôle dans la dynamique des microtubules et la migration cellulaire. Enfin, une dérégulation de son expression, de sa stabilité et/ou de son activité perturbe le déroulement du cycle cellulaire ce qui conduit à la transformation des cellules et favorise l'apparition de cancers. Ses fonctions normales ainsi que ses fonctions lors de la carcinogenèse sont conduites à travers les nombreux partenaires protéiques qui entrent en interaction avec elle. Ils modulent son activité, sa localisation et sa stabilité. En retour Aurora A phosphoryle un bon nombre d'entre eux régulant ainsi leur activité, localisation et stabilité. Cependant, l'analyse des interactions déjà connues d'Aurora A ne permet pas d'expliquer tous les phénotypes observés lors de sa dérégulation. Afin de mieux comprendre les fonctions d'Aurora A, les mécanismes qui la régulent et mettre en évidence ses multiples rôles au sein de la cellule, j'ai construit puis analysé un interactome d'Aurora A généré à partir d'une méthode de purification d'affinité couplée à la spectrométrie de masse en tandem. J'ai identifié 477 partenaires potentiels dont 180 présentant une forte probabilité d'être des partenaires directs de la kinase. L'analyse bioinformatique approfondie de cet interactome a permis de révéler les partenaires associés à des mécanismes liés à la mitochondrie et l'épissage des ARN messagers mettant en évidence une implication potentielle d'Aurora A dans ces mécanismes. Pour valider cet interactome, j'ai choisi d'étudier plus précisément deux partenaires identifiés dans cette étude : les protéines WDR62 et CEP97. J'ai montré que ces deux partenaires co-localisent avec Aurora A et sont phosphorylés par la kinase.

WDR62 est impliquée dans la microcéphalie et est dérégulée dans certains cancers. J'ai montré qu'Aurora A phosphoryle WDR62 en mitose et que cette phosphorylation est nécessaire à sa localisation aux centrosomes.

CEP97 est une protéine du cil primaire encore peu caractérisée et des anomalies du cil primaire sont associées aux ciliopathies. Or l'activité d'Aurora A est nécessaire au désassemblage du cil primaire. J'ai montré qu'Aurora A phosphoryle *in vitro* CEP97 et que l'inhibition de l'activité d'Aurora A dans les cellules perturbe la localisation de CEP97 au niveau des cils et des centrosomes.

Ainsi, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un nombre important de nouveaux partenaires d'Aurora A associés à de nouvelles fonctions. L'étude de ces nouvelles fonctions liées aux mitochondries et à l'épissage des ARN, constitue deux nouveaux projets actuellement menés par des collaborateurs au sein de notre institut.

Abstract

The serine-threonine kinase Aurora A is an essential mitotic cell cycle protein. Aurora A is necessary for mitotic entry and for the maturation and separation of centrosomes. It participates in mitotic spindle assembly and chromosome biorientation, and it is essential for the completion of cytokinesis. Furthermore, Aurora A activity is necessary for the equal distribution of mitochondria to daughter cells and, through its role in the alternative splicing of mRNA of apoptotic factors, it provides a link between cell cycle control and apoptosis. Beyond its mitotic functions, several recent studies suggest that Aurora A is also important during interphase. Notably, it influences microtubule dynamics, promotes cell migration and polarity control and is essential for primary cilia disassembly. Reflecting the fact that Aurora A is found to be up-regulated in many cancers, deregulation of Aurora A activity can result in an aberrant cell cycle, ultimately leading to malignant transformation of cells.

The crucial regulation of Aurora A's numerous functions is achieved through its interaction with several protein partners, which modulate its activity, localisation and stability. Aurora A in turn phosphorylates a number of them, thus regulating their activity, localisation and stability. However, the known interactions of Aurora A cannot explain all the phenotypes that have been described of its deregulation.

To better understand the functions of Aurora A, the regulation mechanisms governing it, and to expose its multiple roles in the cell, I have built and analysed an Aurora A interactome using tandem affinity purification coupled with mass spectrometry. This resulted in the identification of 477 potential interacting partners, of which, 180 were determined to have a high probability of interacting directly with the kinase.

In-depth bioinformatic analysis of this interactome has revealed the associated partners to be related to mitochondria and mRNA splicing, highlighting the potential involvement of Aurora A in these mechanisms. To validate the interactome, two of the proteins identified in this study, WDR62 and CEP97, were examined in detail. Here I show that these two proteins colocalise with Aurora A, and are phosphorylated by the kinase.

WDR62 is implicated in microcephaly and is deregulated in certain cancers. I have shown that Aurora A phosphorylates WDR62 during mitosis, and that this phosphorylation is necessary for its localisation to the centrosomes. CEP97 is a poorly characterised protein of the primary cilium, abnormalities of which are associated with ciliopathies. I have shown that Aurora A phosphorylates CEP97 in vitro, and that the inhibition of Aurora A activity in vivo perturbs the localisation of CEP97 to cilia and centrosomes.

This study has identified a number of new Aurora A-interacting proteins, implicating the kinase with novel functions. These functions, related to mitochondria and mRNA splicing have opened up a new area for further investigation.

Table des matières

Résumé	III
Abstract	V
Table des matières	VI
Listes des figures	IX
Liste des abréviations et des sigles	X
Remerciements	XII
Introduction générale	1
Introduction	3
1. Modèle d'étude : la cellule humaine	3
1.1. La théorie cellulaire.....	3
1.2. La cellule.....	3
2. Le cycle cellulaire	4
2.1. L'interphase.....	4
2.1.1. La phase G1.....	5
2.1.2. La phase S.....	7
2.1.3. La phase G2.....	9
2.2. La phase mitotique.....	10
2.2.1. La prophase.....	11
2.2.2. La prométaphase.....	12
2.2.3. La métaphase.....	15
2.2.4. L'anaphase.....	16
2.2.5. La télophase.....	17
2.2.6. La cytotélorèse.....	18
2.3. La phase G0 et la ciliogénèse.....	19
2.4. Dérégulation et cancer.....	21
3. La régulation du cycle cellulaire	22
3.1. Les mécanismes de régulation.....	23
3.1.1. La phosphorylation.....	23
3.1.2. La déphosphorylation.....	24
3.1.3. La protéolyse ubiquitine dépendante.....	24
3.2. Les protéines majeures du cycle cellulaire.....	25
3.2.1. Les CDKs.....	25
3.2.2. Le Complexe de Promotion de l'Anaphase - APC.....	28
3.2.3. Les phosphatases mitotiques.....	28
3.2.4. Les kinases mitotiques.....	32
4. Aurora A	34
4.1. La famille de kinase Aurora.....	34
4.2. Structure des kinases Aurora.....	35
4.3. Localisations et fonctions mitotiques.....	36
4.3.1. Aurora A - AURKA.....	36
4.3.2. Aurora B - AURKB.....	37
4.3.3. Aurora C - AURKC.....	40
4.4. Les fonctions d'Aurora A.....	42
4.4.1. Les fonctions mitotiques.....	42
4.4.2. Les fonctions non mitotiques d'Aurora A.....	57
4.5. Les activités carcinogènes d'Aurora A.....	59
4.5.1. Interactions constitutives dérégulées : exemple de RALA.....	60

4.5.2. Nouveaux substrats : exemple de LIMK2	61
4.5.3. Dérégulation de facteurs de transcription	61
4.6. Les inhibiteurs d'Aurora A dans le traitement du cancer	63
5. L'analyse des réseaux d'interactions protéiques	64
5.1. Principe de l'AP-MS	64
5.1.1. Identification des protéines par spectrométrie de masse	64
5.1.2. L'immunoprécipitation (IP)	66
5.1.3. Elimination des contaminants	67
5.2. Analyse des interactomes.....	68
Objectifs de la thèse :.....	71
Matériel et Méthodes	73
1. Protéines recombinantes	73
2. Transfection.....	73
3. Culture cellulaire, synchronisation et inhibition.....	74
4. Western-Blot.....	75
5. Immunofluorescence	75
6. Imagerie de cellules vivantes.....	76
7. Essai kinase <i>in vitro</i>	76
8. Immunoprécipitation d'Aurora A-GFP	76
9. Analyse par spectrométrie de masse.....	77
10. Analyse des données protéomiques	78
11. Analyses bioinformatiques	78
Résultats.....	81
1. Construction du modèle cellulaire	81
1.1. Caractérisation de l'expression de GFP-AurA dans la lignée GFP-AurA-shRNA.....	81
1.2. Caractérisation de la lignée clonage GFP-AURA shARN	82
1.3. Caractérisation de l'expression de GFP-as-AurA dans les lignées GFP-as-AurA-shRNA.....	83
2. Construction et analyse de l'interactome.....	85
2.1. Purification des complexes protéiques dépendants d'Aurora A	85
2.2. Identification des partenaires potentiels d'Aurora A	87
2.3. Classification des partenaires potentiels d'Aurora A	88
2.4. Analyse de l'interactome.....	90
2.5. Annotation et enrichissement en GO.....	94
3. Analyse du partenaire de liaison WDR62	96
3.1. WDR62	96
3.2. Aurora A interagit avec WDR62 en mitose	97
3.3. Aurora et WDR62 colocalisent <i>in vivo</i>	97
3.4. La déplétion de WDR62 ne perturbe pas Aurora A	97
3.5. L'inhibition d'Aurora A entraîne la délocalisation de WDR62	99
3.6. Aurora A phosphoryle WDR62 <i>in vitro</i>	99
3.7. Discussion sur WDR62.....	100
4. Analyse du partenaire de liaison CEP97.....	102
4.1. CEP97	102
4.2. Aurora A interagit avec CEP97 en mitose	102
4.3. Aurora et CEP97 colocalisent <i>in vivo</i>	102
4.4. L'inhibition d'Aurora A entraîne la délocalisation de CEP97	104
4.5. Aurora A phosphoryle CEP97 <i>in vitro</i>	104
4.6. Discussion CEP97	105
Discussion.....	107

Annexe 1	111
Annexe 2	114
Bibliographie	117

Listes des figures

- Figure 0 Liste des partenaires connus d'Aurora A
- Figure 1 Cellule eucaryote en interphase
- Figure 2 Le cycle cellulaire
- Figure 3 Le centrosome
- Figure 4 Le cycle du centrosome
- Figure 5 Architecture du matériel péricentriolaire
- Figure 6 La prophase
- Figure 7 La prométaphase
- Figure 8 Nucléation et dynamique des microtubules
- Figure 9 Forces du fuseau mitotique
- Figure 10 La métaphase
- Figure 11 L'anaphase
- Figure 12 La télophase
- Figure 13 La cytodierèse
- Figure 14 Le cil primaire
- Figure 15 Le principe de la phosphorylation et la déphosphorylation
- Figure 16 La protéolyse ubiquitine dépendante
- Figure 17 L'activation des kinases cycline-dépendantes au cours du cycle cellulaire
- Figure 18 Structure des kinases Aurora
- Figure 19 Localisation des kinases Aurora A au cours du cycle cellulaire
- Figure 20 Aurora B et ses fonctions
- Figure 21 Disjonction des centrosomes
- Figure 22 Régulation de la kinase Aurora A
- Figure 23 Activités carcinogènes d'Aurora A
- Figure 24 Les principes de l'AP-MS
- Figure 25 Caractérisation de l'expression de GFP-AURA dans la lignée clonale GFP-AURA shARN
- Figure 26 Caractérisation de la lignée clonale GFP-AURA shARN
- Figure 27 Caractérisation de l'expression de la GFP-as-AURA
- Figure 28 Démarche expérimentale
- Figure 29 Purification des complexes protéiques dépendants d'Aurora A
- Figure 30 Identification des partenaires potentiels
- Figure 31 Classification des partenaires potentiels d'Aurora A
- Figure 32 Représentation des 180 partenaires de première catégorie
- Figure 33 Interactome des 180 partenaires de forte Pv
- Figure 34 Compartiments cellulaires représentatifs des partenaires d'Aurora A
- Figure 35 Réseau des processus biologiques enrichis au sein de l'interactome d'Aurora A
- Figure 36 Aurora A et WDR62 colocalisent au niveau des pôles
- Figure 37 L'inhibition d'Aurora entraîne la perte de localisation de WDR62 aux pôles
- Figure 38 L'inhibition d'Aurora entraîne la perte de localisation de WDR62 aux pôles
- Figure 39 Aurora A et CEP97 colocalisent au niveau des pôles en mitose
- Figure 40 Aurora A et CEP97 localisent au niveau de la base des cils primaires
- Figure 41 L'inhibition d'Aurora A perturbe la localisation de CEP97
- Figure 42 L'interactome est un outil de prédiction

Liste des abréviations et des sigles

AA	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AP-MS	purification par affinité couplée à l'analyse par spectrométrie de masse
APC	complexe de promotion de l'anaphase
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine TriPhosphate
AurA	Aurora A
BSA	albumine sérique bovine
CDK	protéine kinase cycline-dépendante
CPC	<i>Chromosomal Passenger Complex</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GDP	Guanosine Diphosphate
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	Guanosine TriPhosphate
m/z	rapport masse sur charge
MAP	protéine associée aux microtubules
MS	spectrométrie de masse
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem
MT	microtubule
PBS	tampon phosphate salin
PCM	matrice péricentriolaire
RBP	protéine liée aux ARN
SAC	point de contrôle de l'assemblage du fuseau
SAF	facteur d'assemblage du fuseau
SDS	dodécylsulfate de sodium
snRNP	particule ribonucléoprotéique
γ-TURC	<i>γ-tubulin ring complexe</i>
γ-TUSC	<i>γ-tubulin small complex</i>
GST	<i>Glutathione S-Transferase</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
DTT	<i>dithiothréitol</i>
SAINT	<i>Significance analysis of Interactome</i>

À mon père

Remerciements

Je souhaiterais remercier les membres de mon jury, Dr Florence Gonnet, Dr Patrick Meraldi et Dr Bernard Ducommun d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit et de faire le déplacement pour ma soutenance de thèse.

Je souhaiterais remercier mes directeurs de thèse, Dr Arnaud Droit, Dr Guy Poirier et Dr Claude Prigent de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse franco-québécoise. Merci d'avoir fait les nombreux déplacements France-Canada, Canada-France pour les différentes étapes de ma thèse.

Je souhaiterais remercier les organismes qui ont participé au financement de ma thèse la fondation pour la recherche médicale en France (FRM), la ligue contre le cancer, PROTEO le regroupement québécois de recherche sur la fonction, l'ingénierie et les applications des protéines et Rennes métropole.

Je remercie les membres de mes différentes équipes d'avoir répondu à mes questions et m'avoir aidé dans mes expériences. Je souhaite remercier plus particulièrement Jean-Philippe Gagné, Michelle Rouleau et Chantal Éthier du côté québécois. Du côté de Rennes, je souhaite remercier Jean-Yve Cremet, Gwenael Rabut, Erwan Watrin et Christophe Tiffoche. Je remercie également de leur aide précieuse Danielle Poirier, Geraldine Le Provost et Nadine Gattet.

J'ai également eu la chance de rencontrer plein de gens super, d'avoir noué un bon nombre d'amitiés pendant ma thèse et je tiens à tous vous remercier de m'avoir soutenue, conseillée, encouragée, fait rire, invitée, alimentée et désaltérée... pour m'avoir fait danser, chanter, crier, jouer, faire du sport, visiter la Bretagne et le Canada. La liste est longue et je pourrais écrire un roman en mentionnant les détails de nos liens, mais je vais dans un premier temps essayer de n'oublier personne. Je remercie les anciens : Ewa et sa petite famille, Leslie, Blanca, Manu, Nico, Jocelyn, Benoit, Stephane et Geraldine. Les Français québécois Anne-Laure, Mickael et Caro. La deuxième vague Rennaise Julie, Agata et sa petite famille, Audrey et sa petite famille et Pauline (Popo juste pour moi). Les acolytes de soirée : Lucie, Guillaume (Guigui pour les intimes), Lilian (Lili), Julien (Ju), Sarah et pendant un temps Julien (le petit). Et toutes les personnes cool de l'institut Tanguy et Justine, Yorann, Anthony et Laura, Ferial, Renaud et Élise, Maria, Hafida, Claire, Mélanie et Pierre, Morgane, Gaetan,

Céline, Vasantha, Ronan, Solenne, Marie, Dorothée, les deux Yann, Giulia, Emmanuelle, Mélodie, Xavier, Benjamin, Ghislain, Javier, Miguel et l'Amaryllis !

Je remercie également mes amis qui ont continué à prendre de mes nouvelles malgré la distance, qui sont venus jusqu'au Canada me voir et qui n'ont jamais cessé de m'inviter à toutes les soirées. Je remercie Willoo qui est carrément venu vivre avec nous à Québec, Céline et Guillaume, Fanny et Meryl, Harannie et Benoit, Alexandre et Camille, Jfix et Havy, leur adorable Maelou, Axel et Elise, Vincent, les deux Jérôme, Cyrielle, Marion.

Je remercie particulièrement Raphaël qui a traversé une grande partie de cette difficile aventure avec moi, et sans qui je n'aurais pas été jusqu'au bout. Merci d'avoir partagé ces innombrables bons moments, d'avoir été là dans les moments difficiles et merci de continuer à m'offrir ton soutien. Un grand merci à tes parents également.

Et les meilleurs pour la fin, je remercie mon petit frère chéri Alexis ;) et par dessus tout je remercie mes parents M'man et P'pa, sans vous je n'en serai pas là aujourd'hui, je vous dois beaucoup et je vous en serai toujours reconnaissante.

Introduction générale

Lors de mon projet de thèse j'ai identifié et analysé de nouveaux partenaires protéiques de la kinase humaine Aurora A pour modéliser un interactome. Les protéines kinases de la famille Aurora sont des sérine/thréonine kinases qui catalysent le transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP vers un substrat. Cette modification post-traductionnelle permet ainsi de modifier la localisation, l'activité ou les interactions du substrat. Les kinases Aurora sont présentes chez tous les eucaryotes et sont ubiquitaires. Chez les mammifères, on retrouve trois kinases Aurora : les kinases Aurora A, Aurora B et Aurora C. Ces trois protéines ont une structure très similaire et jouent un rôle essentiel dans les processus de division cellulaire : la mitose et la méiose. Les kinases Aurora A et Aurora B présentent un motif consensus de phosphorylation très similaire; aussi leurs différentes de fonction au cours du cycle cellulaire sont conditionnées par leur localisation et leurs partenaires d'interaction différents au cours du cycle. Aurora A est exprimée en fin de phase S, elle s'accumule au niveau des centrosomes où elle est activée et participe à leur maturation et au processus d'entrée en mitose. Elle joue ensuite un rôle dans l'assemblage du fuseau mitotique, le rassemblement des chromosomes et la cytotélerèse en se localisant sur le fuseau puis le corps médian. Pour finir, Aurora A est dégradée en sortie en mitose et une petite population reste localisée principalement au niveau des centrosomes en interphase.

Pour conduire toutes ses fonctions, Aurora A interagit avec différents types de partenaires qui la stabilisent, modulent son activité kinase, entraînent sa dégradation ou sont des substrats. Un grand nombre de partenaires ont été mis en évidence en début de mitose et sont principalement des activateurs de son activité kinase et des substrats. En fin de mitose, moins de partenaires ont été identifiés et étudiés. Ce sont principalement des phosphatases qui inhibent l'activité de la kinase tout au long de la mitose, tandis que sa liaison avec des médiateurs de sa dégradation est nécessaire pour la progression de la mitose.

Récemment, d'autres fonctions d'Aurora A ont été mises en évidence. Il a été montré qu'Aurora A joue un rôle dans la fission des mitochondries lors de la mitose *via* la phosphorylation de RALA. Elle joue également un rôle dans le désassemblage du cil primaire avant l'entrée en mitose, la réplication de l'ADN, l'épissage alternatif d'ARN apototiques et la fragmentation de l'appareil de Golgi, mais peu ou pas de partenaires d'Aurora A ont été identifiés et étudiés pour ces fonctions.

La liste de ces partenaires montre que les principales études sont faites sur les fonctions mitotiques d'Aurora A et peu de partenaires impliqués dans ses autres fonctions ont été identifiés. C'est dans ce contexte que j'ai réalisé mon projet de thèse qui a consisté à isoler les partenaires protéiques en complexe avec Aurora A et les identifier par spectrométrie de masse. J'ai ensuite analysé les résultats obtenus avec différents outils bio-informatiques pour construire un interactome et mettre en évidence de nouveaux partenaires en interaction forte avec Aurora A. L'analyse de cet interactome a conduit à l'analyse fonctionnelle de s protéines WDR62 et CEP97, deux nouveaux partenaires d'Aurora A localisés aux centrosomes.

Début de mitose	Maturation des centrosomes	Entrée en mitose	Assemblage du fuseau mitotique	
	CEP192 LATS2 Ajuba NDEL1 LIM CENT2-3 PLK1 cofiline LIMK1	Bora PLK1 NPM CDC25 PP1R2 Arpc1b PAK1 PUM2 PP1	TPX2 MCAK UBC9 KIF2A SAF-A DDA3 PP6 TACC3 ASAP KIF11 HURP NEDD1 HAUS8 SPAG5	
Fin de mitose	Progression mitotique	Rassemblage des chromosomes	Assemblage du fuseau central	Cytodiérèse
	CDH1 Ca²⁺/ CHFR Calmodulin PP2A RASSF1A	CENP-A CENP-E	TACC3 p150Glued	CRMP-1 GEF-H1
Autres fonctions	Fission des mitochondries	Désassemblage du cil primaire	Replication de l'ADN	
	RALA	HEF1 PIFO calmodulin HDAC6	Geminin	
	Fragmentation du Golgi		Épissage alternatif	
	?		?	

Types d'interaction :
Stabilisation / **Activation** / **Inhibition** / **Dégradation** / **Substrats**

Figure 0 : Liste des partenaires connus d'Aurora A

Liste des partenaires connus d'Aurora A dans les différentes fonctions cellulaires dans lesquelles elle intervient. En bleu sont représentés les partenaires qui stabilisent Aurora A, en vert ceux qui activent son activité kinase, en rouge ceux qui inhibent son activité kinase, en violet ceux qui régulent sa dégradation et en orange ses substrats.

Introduction

1. Modèle d'étude : la cellule humaine

1.1. La théorie cellulaire

Au début du 17^{ème} siècle, grâce à l'invention du microscope, les scientifiques découvrent le monde microscopique. En 1665, Robert Hooke, un scientifique anglais, utilise pour la première fois le terme « cellule » pour décrire ses observations de la structure du liège. En parallèle, Antoni van Leeuwenhoek, un scientifique hollandais, observe de nombreuses formes de particules mobiles et conclut en 1676 que ces particules sont des organismes vivants.

Il faut pourtant attendre les années 1800 pour que le botaniste Matthias Jakob Schleiden et le zoologiste Theodor Schwann montrent que les plantes et les animaux sont constitués de cellules contenant un noyau et formant des tissus. Le premier principe de la théorie cellulaire est ainsi établi : la cellule est l'unité fondamentale, structurale et fonctionnelle des êtres vivants. Le second principe de la théorie cellulaire est énoncé en 1855 par Rudolph Virchow, un pathologiste allemand, « *Omnis cellula e cellula* » : toute cellule dérive d'une cellule préexistante. En effet, ses travaux ainsi ceux de Robert Brown et Albert Kölliker mettent en évidence que la formation de cellules se fait *via* la scission d'une cellule préexistante [1-4].

1.2. La cellule

On définit la cellule comme une structure délimitée par une membrane plasmique, constituée de phospholipides qui sert de barrière entre l'environnement interne et l'environnement externe de la cellule. À l'intérieur de la cellule se trouve le cytoplasme, une solution aqueuse dans laquelle les biomolécules (protéines, acides nucléiques, lipides et glucides) organisés ou non en organites, forment les éléments structuraux et la machinerie cellulaire (Figure 1).

Il existe deux types cellulaires fondamentaux :

- les cellules procaryotes dont l'ADN, support de l'information génétique, n'est pas séparé du cytoplasme. Les bactéries et les archées sont les deux domaines du vivant étant procaryotes.

- les cellules eucaryotes dont l'ADN est séparé du cytoplasme par une membrane formant une structure appelée le noyau (Figure 1).

Les plantes et les animaux sont des organismes multicellulaires eucaryotes et présentent une organisation cellulaire interne complexe. L'être humain est constitué d'environ cent mille milliards de cellules eucaryotes [5].

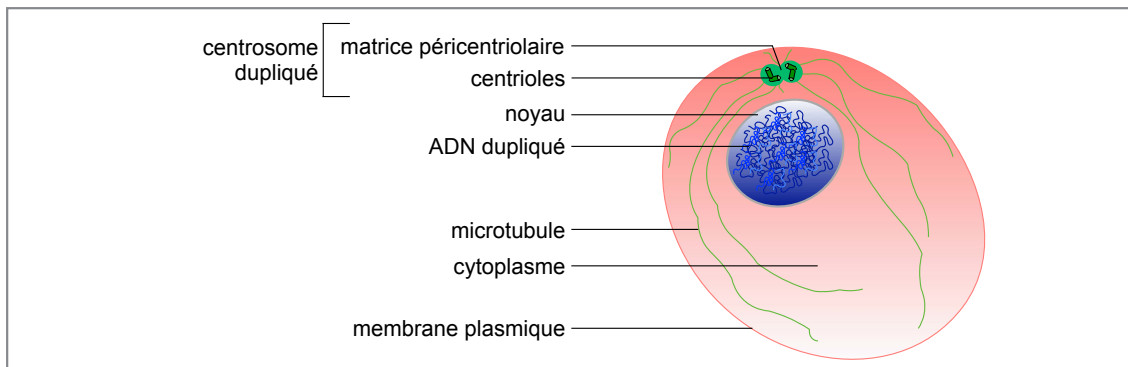


Figure 1 : Cellule eucaryote en interphase (d'après [6])

Représentation schématique d'une cellule eucaryote en interphase après la phase S. La cellule est délimitée par une membrane plasmique composée de phospholipides. L'ADN, dupliqué pendant la phase S, est séparé du cytoplasme par le noyau. Le centrosome, lui aussi dupliqué en phase S, se trouve à proximité du noyau et est composé de deux paires de centrioles et d'une matrice péricentriolaire. Il sert à la nucléation des microtubules.

2. Le cycle cellulaire

Les cellules ont la capacité de se dupliquer pour permettre leur renouvellement. La reproduction des cellules eucaryotes est conduite par une séquence d'événements hautement régulés appelée le cycle cellulaire (Figure 2).

Le cycle cellulaire peut être divisé en deux phases principales :

- I. L'interphase, généralement la plus longue phase, est dédiée à la duplication du contenu cellulaire.
- II. La phase M ou mitose est dédiée à la division du contenu cellulaire dupliqué de la cellule mère entre les deux cellules filles résultantes. Ce terme a été utilisé pour la première fois en 1882 par Walther Flemming [6].

2.1. L'interphase

Durant l'interphase, la cellule augmente de volume et se prépare à l'entrée en phase M. La plupart des composants de la cellule sont répliqués de manière continue. Seuls l'ADN présent dans le noyau et les centrioles présents dans le cytoplasme, composants majeurs des centrosomes, ne sont dupliqués qu'une fois par cycle. Cette étape spécifique est appelée la phase S (pour phase de synthèse de l'ADN). Entre la phase S et la phase M, il y a généralement des phases de régulation additionnelles appelées phases G (G1 et G2 pour *Gap1* et *Gap2* ou intervalle 1 et intervalle 2). La

phase G1 précède la phase S et la phase G2 précède la phase M [7]. Pendant ces phases, la cellule passe par différents points de contrôle qui permettent de vérifier que certains événements cellulaires critiques ont été accomplis avant de progresser vers l'étape suivante (Figure 2). Des retards dans la progression du cycle cellulaire peuvent survenir si ces opérations n'ont pas été correctement effectuées.

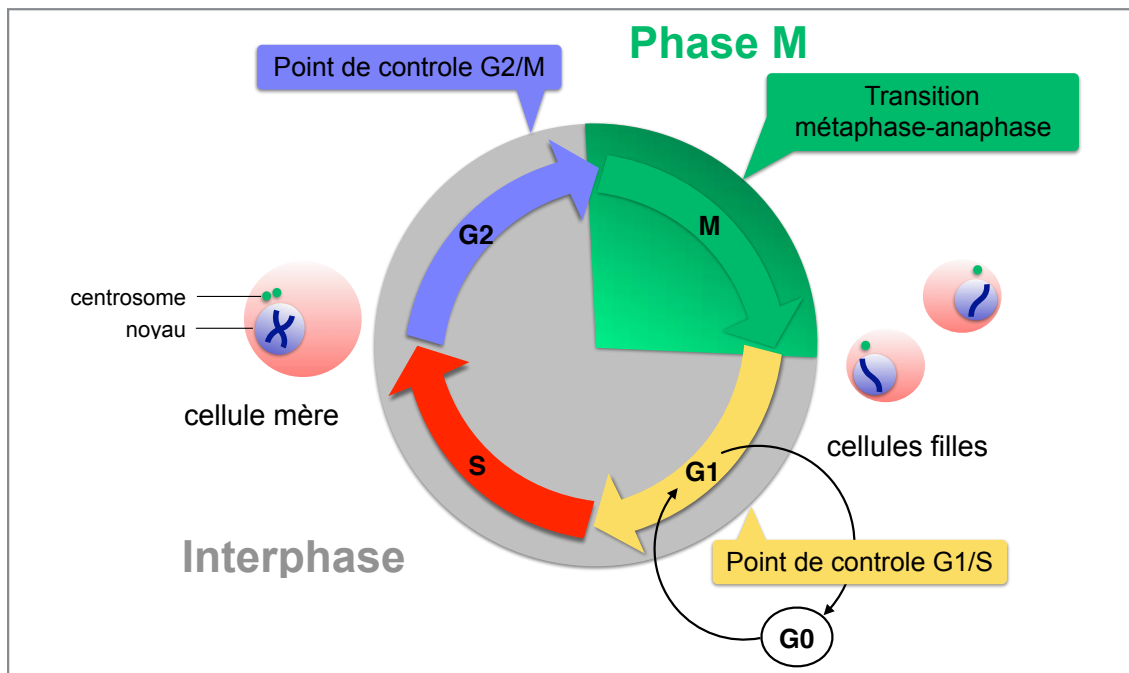


Figure 2 : Le cycle cellulaire (d'après [6])

Représentation schématique des phases du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire se divise en deux grandes phases : l'interphase et la phase M. Le cycle commence en interphase, la cellule mère entre en phase G1 pendant laquelle elle croît. À cette phase, le point de contrôle G1/S permet d'arrêter le cycle en cas de dommages à l'ADN ou de croissance insuffisante et la cellule entre en phase G0. Le cycle cellulaire continue en phase S pendant laquelle l'ADN et le centrosome sont dupliqués. La cellule passe ensuite en phase G2 pendant laquelle elle continue sa croissance. Avant l'entrée en phase M, le point de contrôle G2/M permet d'arrêter la cellule en cas de dommages à l'ADN. La cellule peut se réparer avant d'entrer en phase M ou entrer en apoptose quand les dommages sont trop importants. En phase M, la cellule subit d'importants changements physiques pour conduire à sa division. Au cours de cette phase, le point de contrôle métaphase-anaphase permet la répartition égale des chromosomes dans les cellules filles en arrêtant le cycle le temps de permettre la bi-orientation des chromosomes. En fin de phase M, les cellules filles sont séparées physiquement.

2.1.1. La phase G1

Le cycle cellulaire débute par la phase G1. Durant cette phase, il y a croissance cellulaire : la cellule augmente sa taille jusqu'à la doubler *via* la synthèse de protéines, membranes, organites et autres composants. La croissance cellulaire est régulée intrinsèquement et par les facteurs de croissance présents *dans* l'environnement extracellulaire. En milieu/fin de phase G1, le premier point de contrôle du cycle cellulaire intervient. Ce point de contrôle est appelé point de restriction : si la

croissance cellulaire est insuffisante ou si l'ADN est endommagé, la cellule sort du cycle cellulaire. Elle entre alors dans un état de non division prolongé, le temps de retrouver les conditions idéales à la croissance cellulaire. On dit alors que les cellules sont quiescentes ou en phase G0 (Figure 2).

La forme, la polarité et la mobilité des cellules en phase G1 dépendent du cytosquelette de la cellule et notamment des microtubules (MTs). Les MTs sont organisés *via* le centrosome, une structure essentielle au cycle cellulaire des cellules humaines (Figure 1). En effet, la principale fonction du centrosome est l'organisation dynamique des MTs et durant la mitose, il permet la mise en place du fuseau bipolaire de MTs nécessaire à la ségrégation des chromosomes. En phase G1, le centrosome est formé de deux centrioles, petites structures cylindriques constituées de neuf triplets inclinés de MTs et intégrées dans une matrice protéique appelée matériel péri-centriolaire (PCM). Les deux centrioles sont d'âges différents. L'un directement hérité de la cellule mère est mature et possède des appendices distaux et subdistaux. Ce centriole appelé centriole père est capable de nucléer et organiser les microtubules. L'autre centriole est immature, il est issu de la duplication et sa capacité à nucléer des MTs est limitée. Les centrioles sont liés par des fibres protéiques interconnectées constituées des protéines CEP250 (aussi appelée C-Nap1), rootletin, CEP68, LRRC45 et β -catenin (Figure 3, Figure 4i) [8].

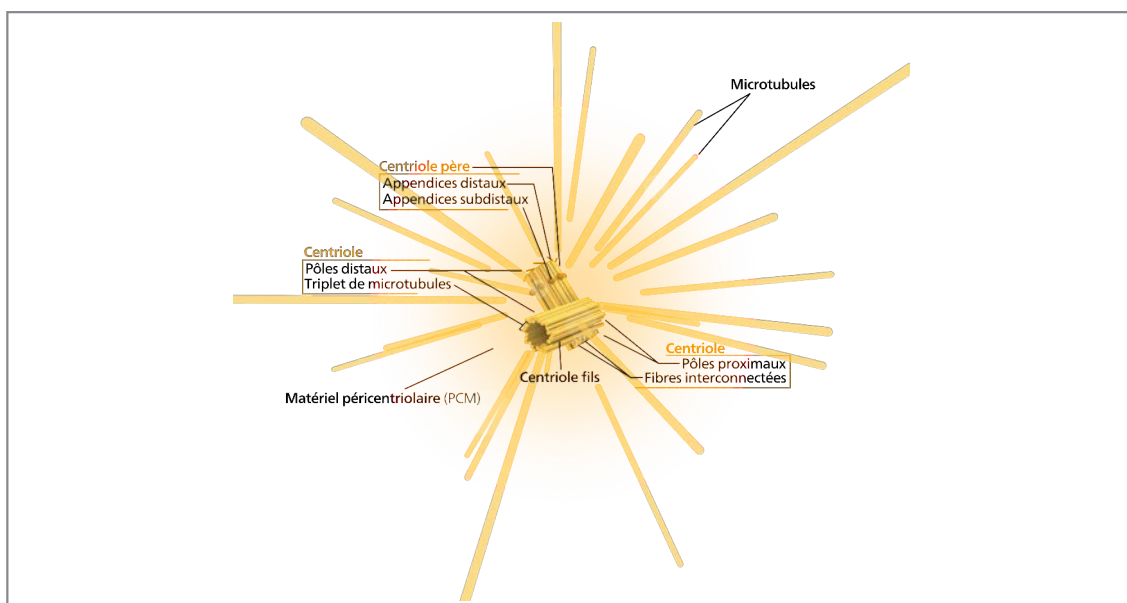


Figure 3 : Le centrosome (Centrosome-borderless version-fr by © Hawk-Eye)

Représentation schématique de la structure d'un centrosome. Le centrosome se compose de deux centrioles : le centriole père, mature et possédant les appendices distaux et subdistaux et le centriole fils immature. Constitués de neuf triplets de microtubules, les centrioles sont positionnés perpendiculairement et sont reliés par des fibres interconnectées au niveau de leur pôle proximal. Autour des centrioles, on trouve la matrice péri-centriolaire à partir de laquelle les microtubules de la cellule sont nucléés.

2.1.2. La phase S

Si les conditions sont réunies lors de la phase G1, la cellule entre en phase S avec la synthèse de l'ADN. L'événement majeur de cette phase est la duplication des chromosomes : le matériel génétique est doublé *via* la réplication de l'ADN. Le but est d'obtenir exactement deux copies identiques du jeu de chromosomes de la cellule (46 chromosomes répartis en 23 paires dans les cellules somatiques humaines) [9].

Une autre structure est dupliquée exactement une fois lors du cycle cellulaire, c'est le centrosome. La duplication des centrosomes s'initie à la transition G1/S quand un nouveau centriole, appelé procentriole, commence à croître perpendiculairement aux pôles proximaux de chaque centriole existant (Figure 4-ii).

La formation des procentrioles a lieu à un site unique de chaque centriole existant, appelé origine de duplication du centriole. La localisation précise des protéines PLK4, SASS6 et STIL à ce site permet le contrôle du nombre de centrioles formés. Quand l'origine de duplication est définie sur les centrioles existants, il y a formation d'une structure appelée roue de charrette (*cartwheel*) à partir d'oligomères de SASS6 et des protéines CEP135 et CPAP (CENPJ). Cette structure, physiquement reliée par une tige protéique aux pôles proximaux des centrioles existants, est utilisée comme une base à l'assemblage séquentiel des neuf triplets de MTs constitués de dimères d' α/β -tubuline. Le complexe protéique γ -TUSC (*γ -tubulin small complex* - 2 molécules de γ -tubuline en complexe avec les protéines GCP2 et GCP3) initie la nucléation des MTs tandis que la centrobine stabilise les dimères d' α/β -tubuline. L'élongation des MTs des centrioles est favorisée par les protéines CPAP, CEP120 et SPICE1 et stoppée par les protéines CP110 et CEP97 qui se fixent sur l'extrémité « plus » des microtubules de centrioles et stoppent leur élongation. La protéine hPOC5 permet l'assemblage de la portion distale des centrioles (Figure 4- iii) [8, 10, 11].

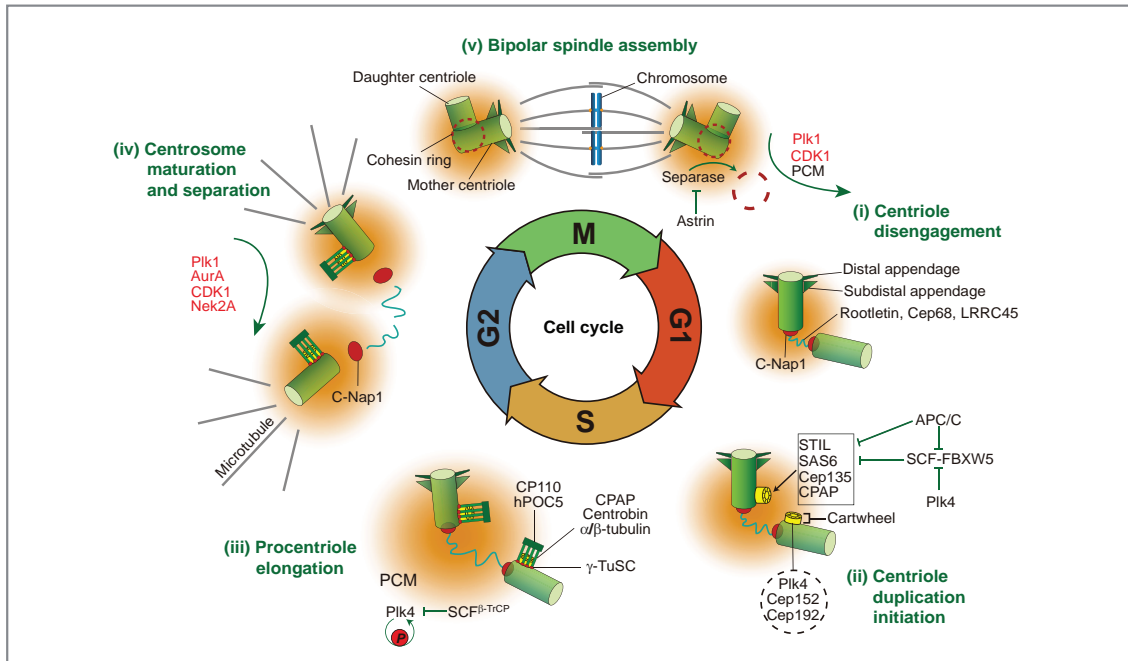


Figure 4 : Le cycle du centrosome [8]

Représentation schématique des événements du cycle du centrosome et de ses principales protéines régulatrices. Le cycle du centrosome est un enchaînement d'étapes en lien avec le cycle cellulaire. i - Le désengagement des centrioles : de la fin de la phase M jusqu'en début de phase G1, l'anneau de cohésines qui maintient les centrioles est déplacé et ce processus est régulé par PLK1, CDK1, PCM, la séparase et l'astrin. Après le désengagement un lien protéique principalement constitué de C-NAP1, rootletin, CEP68, LRRC45 et β -catenin est établi entre le centriole père et le centriole fils. ii - L'initiation de la duplication des centrioles : CEP152 et CEP192 sont responsables du recrutement de PLK4 qui initie la duplication des centrioles. Ensuite, CEP135, SAS6, STIL et CPAP s'assemblent pour former la base structurale en forme de roue de charrette *via* la régulation par l'APC, SCF-FBXW5 et PLK4. iii - L'élongation des procentrioles : les centrioles sont formés de MTs de dimères d' α/β -tubuline nucléés à partir du complexe γ -TUSC et stabilisés par la centrobine. CEP110 et CPAP ont une action antagoniste permettant de réguler la taille des centrioles tandis que hPOC5 permet l'assemblage de la portion distale. Pour empêcher la réplication des centrioles, la dégradation de PLK4 est induite par son autophosphorylation et l'action de SCF ^{β -TrCP}. iv - Séparation et maturation des centrosomes : en phase G2, les appendices distaux et sub-distaux du nouveau centriole père sont formés tandis qu'il est disjoint de l'autre centriole père. Les deux centrosomes recrutent ensuite des protéines de la PCM et se séparent. Ces processus sont régulés par les kinases mitotiques PLK1, AurA, CDK1 et Nek2A. v - Assemblage du fuseau bipolaire : en phase M, les centrosomes agissent comme des centres organisateurs de MTs pour permettre l'assemblage du fuseau mitotique.

2.1.3. La phase G2

La phase G2 est la seconde phase intervalle, elle suit la phase S et précède la mitose. Durant cette phase, la cellule croît rapidement et se prépare à l'entrée en mitose. Au cours de cette phase un second point de contrôle du cycle cellulaire intervient, il est appelé point de contrôle G2/M ou contrôle des dommages à l'ADN (Figure 2). Ce point de contrôle agit comme un interrupteur moléculaire : en réponse à un stress génotoxique entraînant des dommages à l'ADN, il permet l'arrêt du cycle cellulaire avant l'entrée en mitose. Cet arrêt du cycle permet à la cellule de réparer son ADN avant de reprendre son cycle ou si les dommages sont trop importants, déclencher des signaux de mort cellulaire.

Le cycle du centrosome continue également lors de cette phase. Il y a disjonction puis maturation des centrosomes. Celle-ci se traduit par une augmentation de la taille des centrosomes grâce au recrutement de protéines de la matrice péricentriolaire dont la γ -tubuline. Cette molécule s'assemble et forme des complexes en anneau appelés γ -TURCs (*γ -tubulin ring complexe* - plusieurs complexes γ -TUSC assemblés avec les protéines GCP4-6) qui permettent la nucléation des MTs.

Les processus de disjonction et maturation impliquent l'activité des kinases mitotiques PLK1, Aurora A, CDK1 et NEK2A qui régulent la dissociation de C-Nap1 et le recrutement des protéines de la matrice (Figure 4 - iv).

Traditionnellement décrite comme une matrice amorphe, il a été montré récemment grâce à des méthodes d'imagerie en microscopie de super-résolution, que le matériel péricentriolaire possède en réalité une architecture protéique hautement ordonnée [12]. La couche proximale, proche de la paroi des centrioles et visible sur les centrosomes en interphase, est composée de deux architectures : (Figure 5 - A)

1. Les protéines péricentrine (PCNT) et CEP152 (*Centrosomal protein of 152 kDa*) qui forment des fibres de plusieurs centaines de nanomètres s'éloignant de la paroi des centrioles.
2. Entre ces fibres, des molécules interdispersées de CEP215 (ou CDK5RAP2), CEP192 et γ -tubulines forment une matrice.

Lors de la maturation, la couche proximale se développe *via* la formation d'une structure supplémentaire : une matrice externe constituée de péricentrines, de CEP125 et de CEP192. Les complexes γ -TURC, d'où sont nucléés les MTs, sont enfoncés dans cette matrice externe (Figure 5 - B) [12].

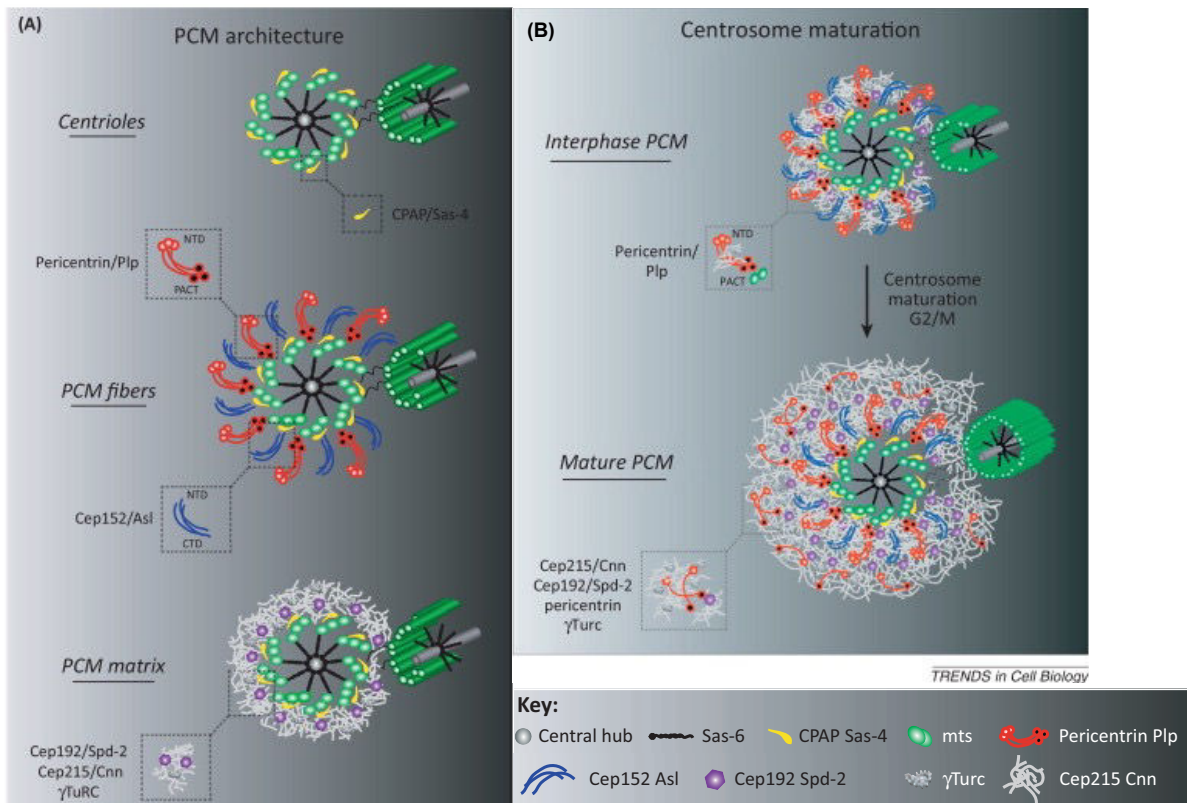


Figure 5: Architecture du matériel péracentriolaire [12]

Représentation schématique des éléments de l'architecture du matériel péracentriolaire. A-La PCM en interphase se compose de fibres de péracentrines et CEP152 ancrées dans une matrice composée des protéines CEP192, CEP215 et γ -tubuline. B-Lors de la maturation des centrosomes, une matrice externe se constitue avec le recrutement de protéines CEP192, CEP215, γ -tubuline et péracentrine supplémentaires.

2.2. La phase mitotique

Bien que généralement plus courte que l'interphase qui dure 24 heures pour les cellules humaines, la phase mitotique se déroule pendant une à deux heures. Elle se définit comme un processus hautement régulé impliquant des centaines de protéines et induisant d'importants changements au sein de la cellule (Figure 2).

Le matériel génétique dupliqué pendant la phase S est condensé en une structure compacte hautement organisée : les chromosomes. Chaque jeu de chromosomes identiques est fermement attaché par paire et forme des chromatides-soeurs.

La séparation des chromatides et leur égale distribution dans les cellules filles dépendent d'une structure protéique, le fuseau mitotique, un réseau bipolaire de MTs mis en place grâce aux centrosomes dupliqués puis séparés (Figure 8).

Durant la phase M, deux événements majeurs ont lieu : la division de l'information génétique en deux lots identiques, suivie de la division physique des deux cellules filles. On divise généralement la mitose en cinq sous-étapes qui se distinguent par l'arrangement physique des chromatides-soeurs et du fuseau mitotique. Dans l'ordre

de progression du cycle cellulaire, ces phases sont la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

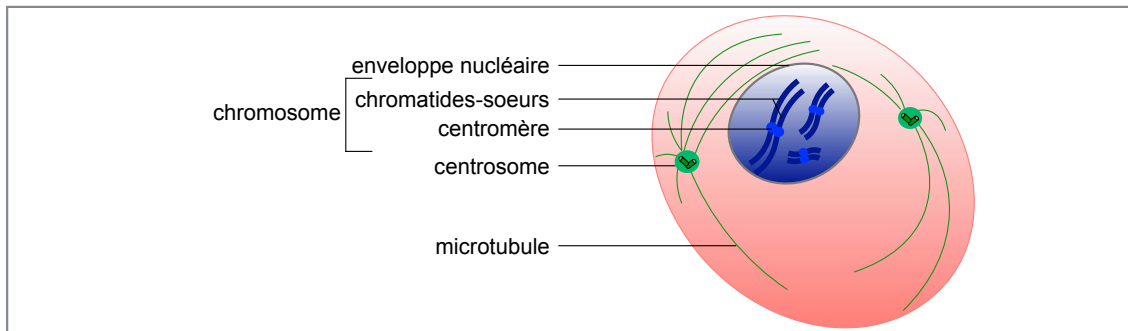


Figure 6 : La prophase (d'après [6])

Représentation schématique d'une cellule eucaryote en prophase. L'ADN nucléaire est condensé en chromosomes qui se composent de deux chromatides-soeurs reliés au niveau du centromère. Les centrosomes nucléent des microtubules et commencent à se séparer.

2.2.1. La prophase

Lors de la prophase, la première étape de la mitose, l'ADN nucléaire est condensé sous forme de chromosomes qui s'apparient en chromatides-soeurs (Figure 6). Ce sont principalement deux familles de protéines qui sont responsables de ce phénomène :

- Les complexes de condensines, présents sous la forme de complexes allongés, lient et encerclent l'ADN à différents endroits, le long de la chromatine.
- Les complexes cohésines rassemblent les chromatides-soeurs.

Les centrosomes dupliqués et matures commencent à nucléer des MTs initiant leur séparation.

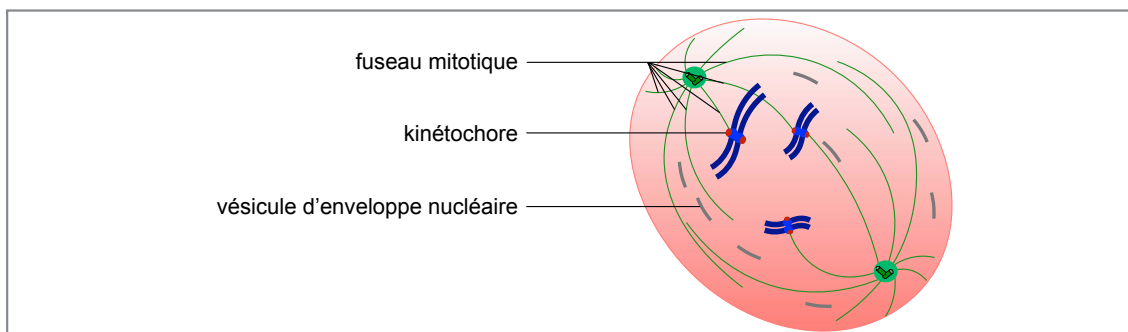


Figure 7 : La prométaphase (d'après [6])

Représentation schématique d'une cellule eucaryote en prométaphase. L'enveloppe nucléaire est fragmentée libérant les chromosomes et les SAFs. Les chromosomes sont pris en charge par le fuseau mitotique en assemblage qui les lie au niveau des kinétochores.

2.2.2. La prométaphase

La prométaphase s'initie avec la rupture de l'enveloppe nucléaire (Figure 7). Libérés dans le cytoplasme, les chromosomes sont capturés par les microtubules du fuseau mitotique en assemblage (Figure 8) [13].

Les centrosomes migrent chacun vers un pôle opposé de la cellule grâce au réseau dynamique de microtubules nucléés entre ces pôles.

Les microtubules sont des cylindres creux, polarisés, formés de 13 protofilaments de polymères d' α - β tubulines. Aux pôles se trouvent les extrémités « moins », la croissance est lente. Les extrémités « plus » pointent vers l'extérieur des pôles où la croissance est rapide *via* l'association de nouveaux dimères d' α - β tubulines.

Dans les cellules animales en mitose, les MTs sont nucléés à partir de deux sites majeurs d'organisation des MTs : le centrosome et la chromatine (Figure 8).

Au niveau de la chromatine, deux cascades de signalisation sont impliquées. La première est générée localement par le complexe CPC (*Chromosomal Passenger Complex* - voir chapitre Aurora B) au niveau des kinétochores : une structure supramoléculaire assemblée sur chacune des chromatines-soeurs, au niveau des centromères de part et d'autre du chromosome. La seconde est liée au gradient de Ran-GTP (Ran-Guanosine TriPhosphate) centré sur la chromatine. Quand l'enveloppe nucléaire se rompt, les chromosomes et des composants nucléaires comme les facteurs d'assemblage du fuseau (SAFs) deviennent accessibles aux MTs. Le SAF Ran est une petite GTPase qui régule le transit nucléocytoplasmique. Ran est active lorsqu'elle lie la GTP et inactive avec l'hydrolyse de la GTP en GDP (Guanosine Diphosphate). Sa réactivation dépend de la dissociation et du remplacement de la GDP par une nouvelle molécule de GTP. La réaction d'hydrolyse de la GTP requiert la participation de la protéine RanGAP (*GTPase-activating protein*) tandis que l'échange de la GDP en GTP est catalysé par le facteur d'échange de guanine RCC1. La quantité de forme active, Ran-GTP, est donc déterminée par la quantité relative de RanGAP et RCC1. En interphase, lors du transport vers le noyau, les protéines qui doivent être importées contiennent un signal de localisation nucléaire qui permet leur liaison aux importines (2 sous-unités α et β). Une fois dans le noyau, les protéines sont libérées des importines grâce à Ran qui enlève et lie les importines. En mitose, il n'y a plus de séparation cytoplasme/nuéoplasme. RCC1, lié à la chromatine, génère une forte concentration de Ran-GTP autour des chromosomes. Ce gradient permet de libérer des importines, les SAFs nucléaires tels que TPX2, HURP et NuMa qui peuvent ainsi participer à l'assemblage du fuseau (Figure 8).

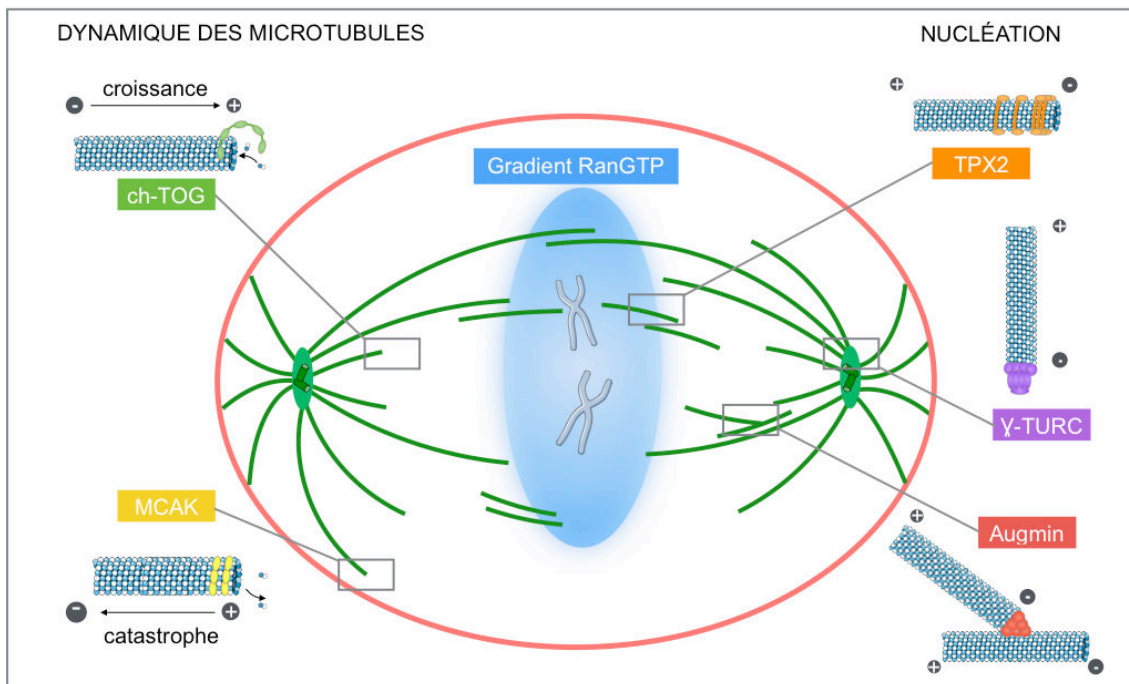


Figure 8 : Nucléation et dynamique des microtubules (d'après [13])

Représentation schématique des principaux complexes protéiques impliqués dans la nucléation et la dynamique des microtubules. Le complexe γ -TURC est le principal centre organisateur des MTs et permet leur nucléation au niveau des pôles. Il permet la nucléation des MTs au niveau des MTs pré-existants grâce à la présence du complexe Augmin. Au niveau du gradient Ran-GTP centré sur les chromosomes, il permet la nucléation des MTs grâce à la présence du SAF TPX2. La MAP ch-TOG participe à la croissance et la stabilité des MTs tandis que MCAK s'oppose à cette action en déstabilisant les complexes α/β -tubulines et induit la dépolymérisation des MTs.

En plus de l'action des cascades de signalisation associées à la chromatine décrites ci-dessus, les MTs peuvent également être générés à partir des réseaux de MTs pré-existants *via* un mécanisme dépendant du complexe Augmin, constitué de 8 sous-unités HAUS (*HAUS augmin-like complex subunit 1-8*) (Figure 8).

Grâce à la redondance des différents mécanismes de génération des MTs et leur indépendance les uns par rapport aux autres, l'assemblage du fuseau est un processus très robuste. Les propriétés dynamiques des MTs du fuseau sont ensuite modulées par des protéines associées aux microtubules (MAPs) et des protéines motrices. Chaque aspect de la vie des MTs : nucléation, croissance, rétrécissement, arrêt et passage d'un état à l'autre, est articulé par ces protéines (Figure 8 et 9).

Les MTs sont stabilisés par des protéines divisées en deux groupes :

- les protéines stabilisatrices des extrémités « moins » qui les lient et les réticulent pour former des pôles focalisés.
- les protéines stabilisatrices des extrémités « plus » qui favorisent la croissance des MTs, bloquent les protéines déstabilisatrices et permettent la liaison avec les protéines du kinétochore et du cortex cellulaire (ch-TOG = CKAP5).

Les protéines déstabilisatrices sont des facteurs qui fragilisent les assemblages de MTs en induisant leur rétrécissement rapide *via* la déstabilisation et la dépolymérisation des protofilaments (MCAK = KIF2C).

Ainsi, les MTs présentent une instabilité dynamique, ils sont capables de passer d'un état de croissance rapide à un état de rétrécissement rapide sous l'influence de signaux protéiques.

Les protéines motrices sont des moteurs moléculaires qui se déplacent le long des microtubules et sont chargés du transport de molécules cargo. En mitose, ces protéines lient entre eux les MTs créant des faisceaux générateurs de force et permettent l'auto-organisation des MTs en fuseau mitotique.

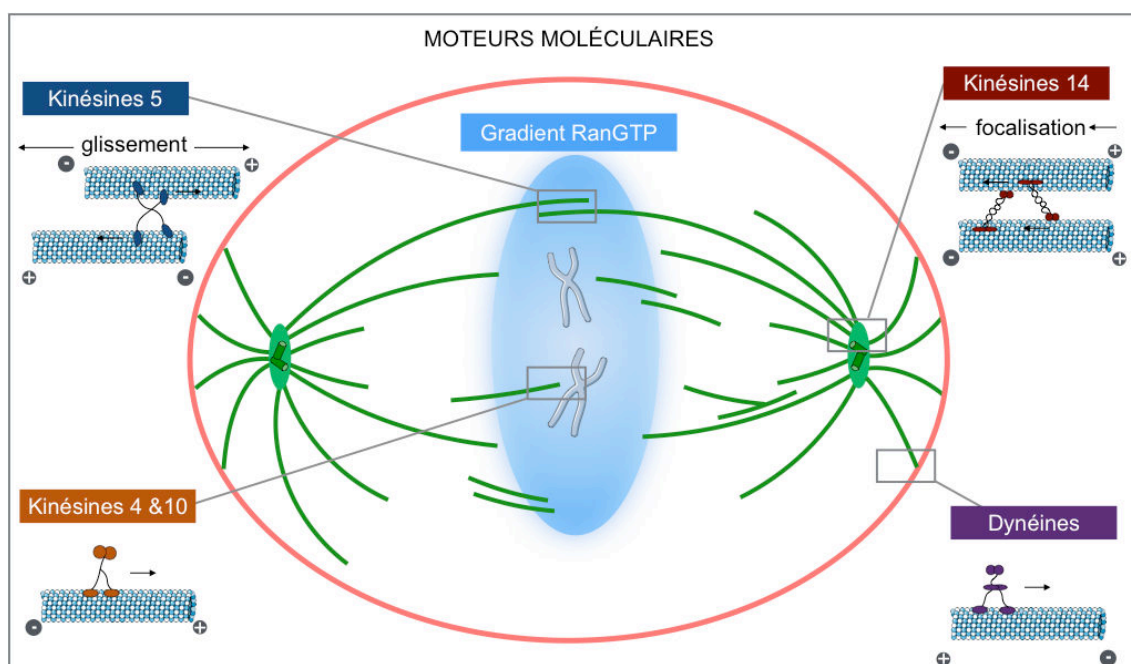


Figure 9 : Forces du fuseau mitotique (d'après [13])

Représentation schématique des principaux moteurs moléculaires impliqués dans l'organisation du fuseau mitotique et la génération des forces de tension. Les kinésines-5 réticulent les extrémités « plus » des MTs polaires et les font glisser au niveau de l'équateur de la cellule, les kinésines-14 focalisent les extrémités « moins » des MTs et s'opposent aux kinésines-5, les kinésines 4 et 10 bougent vers les extrémités « plus » des MTs kinétochoriens et permettent leur liaison aux chromosomes et les dynéines se déplacent vers les extrémités « moins », permettent la liaison au cortex de la cellule et contrebalancent les autres moteurs.

Deux familles de protéines motrices sont principalement impliquées dans l'assemblage du fuseau : les kinésines et les dynéines (Figure 9).

- La kinésine-5 se déplace vers l'extrémité « plus » des microtubules et forme des homotétramères qui maintiennent les MTs antiparallèles tout en leur permettant de glisser pour maintenir le fuseau bipolaire (Eg5 = KIF11).
- La kinésine-14 se déplace vers les extrémités « moins » des MTs et s'oppose à

la kinésine 5. Elle réticule les MTs polaires pour les faire glisser les uns sur les autres ou se focaliser au niveau des pôles.

- les kinésines 4 et 10 se déplacent vers les extrémités « plus » et font la liaison entre les chromosomes et le fuseau contribuant au positionnement des chromosomes et à leur séparation.
- les dynéines cytoplasmiques qui se déplacent vers les extrémités « moins », réticulent les MTs aux pôles, servent de liaison entre les MTs astraux et le cytosquelette d'actine au cortex. Elles jouent un rôle majeur en contrebalançant les autres moteurs et participent notamment au rassemblement des chromosomes.

Grâce à leur instabilité dynamique, les MTs explorent la cellule et sont stabilisés lorsqu'ils trouvent un chromosome et s'attachent sur un kinétochore.

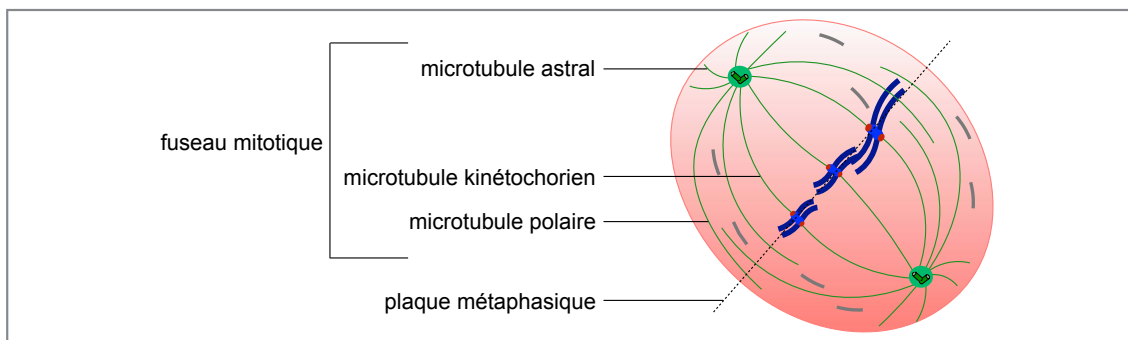


Figure 10 : La métaphase (d'après [6])

Représentation schématique d'une cellule eucaryote en métaphase. Les chromosomes sont rassemblés et bi-orientés sur la plaque métaphasique grâce au fuseau mitotique assemblé. Il se compose des microtubules astraux qui relient les pôles à la membrane plasmique, des microtubules polaires qui s'intercalent à l'équateur et les fibres kinétochoriennes qui relient les chromosomes aux centrosomes.

2.2.3. La métaphase

Pour une ségrégation correcte, les chromosomes doivent être bi-orientés (Figure 10). Les MTs qui leur sont attachés doivent provenir des deux pôles opposés du fuseau. La bi-orientation se fait en même temps que le rassemblement des chromosomes : le processus par lequel les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique à une position équidistante des deux pôles du fuseau. Un fois alignés, les chromosomes subissent un mouvement de va-et-vient, de part et d'autre de la cellule, jusqu'à ce que les forces de tension s'équilibrent au niveau des pôles. Le fuseau mitotique complètement assemblé comprend alors trois classes de fibres :

- les fibres kinétochoriennes : elles relient les centrosomes aux chromosomes, produisent les forces de tensions du fuseau et conduisent à la ségrégation des

chromatides-soeurs en anaphase. Chez l'Homme, entre 20 et 30 MTs sont associés en faisceau pour former ces fibres et leurs extrémités « plus » sont attachées aux kinétochores.

- les faisceaux de MTs polaires étendus à partir des centrosomes jusqu'à l'équateur de la cellule, ils s'intercalent avec les MTs polaires de l'autre pôle et glissent les uns sur les autres pour séparer les centrosomes.
- les MTs astraux se développent autour des centrosomes vers la membrane cellulaire. Ils permettent le positionnement des centrosomes et du fuseau en ancrant chaque pôle du fuseau à la membrane plasmique.

La mise en place du fuseau mitotique bipolaire est sous la surveillance d'un important point de contrôle du cycle cellulaire, le point de contrôle métaphase-anaphase (*Spindle assembly checkpoint* : SAC) qui permet de maintenir un nombre égal de chromosomes dans chaque cellule fille (Figure 2). Le SAC permet de surveiller l'attachement correct des microtubules aux kinétochores. La séparation égale des chromatides-soeurs est obtenue grâce à l'attachement bi-orienté de chaque paire de chromatides. La présence d'un kinétochore libre ou d'un attachement aberrant maintient le SAC actif et empêche le déclenchement prématuré de l'anaphase en inhibant le clivage des cohésines qui maintiennent les chromatides-soeurs associées et la dégradation de la cycline B qui associée à CDK1 maintient la cellule en mitose.

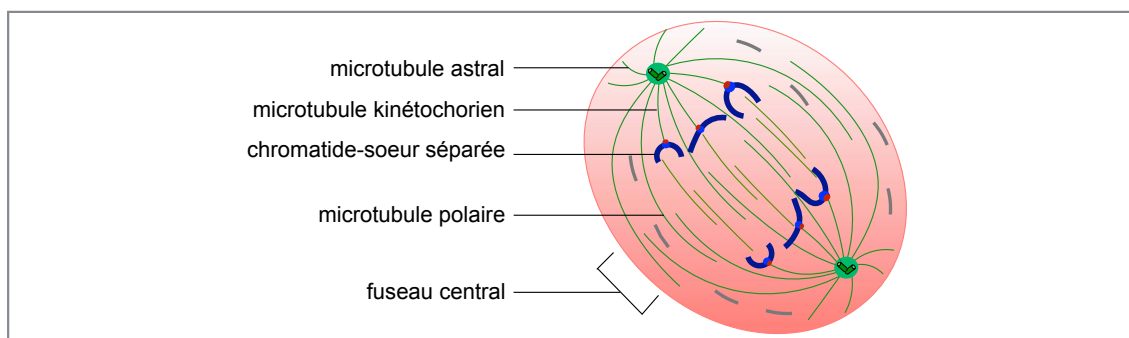


Figure 11 : L'anaphase (d'après [6])

Représentation schématique d'une cellule eucaryote en anaphase. Les microtubules astraux ancrent les centrosomes à la membrane tandis que les chromosomes sont tirés vers les pôles par les fibres kinétochoriennes. Le fuseau central s'assemble entre les deux lots de chromosomes et les pousse vers les pôles.

2.2.4. L'anaphase

La cellule progresse ensuite en anaphase, une étape durant laquelle les chromatides-soeurs de chaque chromosome sont séparées et déplacées, chacune vers un pôle opposé de la cellule (Figure 11) [14]. La séparation requiert le clivage rapide des molécules de cohésines par des protéases appelées séparases. Ensuite, les

chromatides-soeurs attachées au fuseau mitotique par les fibres kinétochoriennes sont séparées.

Les mouvements de séparation des chromosomes par le fuseau peuvent être divisés en deux étapes. Durant la première étape, l'anaphase A, les fibres kinétochoriennes raccourcissent et tractent les chromosomes vers les pôles. Lors de l'anaphase B, un fuseau central de microtubules se met en place entre les deux lots de chromosomes séparés. Ce fuseau pousse sur les deux lots de chromosomes éloignant par la même occasion les deux centrosomes l'un de l'autre. Le fuseau central joue aussi un rôle important dans la coordination entre le point de clivage des deux cellules filles et le fuseau mitotique, pour une séquestration effective des deux lots de chromosomes dans chaque cellule fille résultante. Bien que le fuseau central ressemble au fuseau mitotique, des facteurs distincts organisent ces deux structures. Par exemple un assemblage *de novo* du fuseau central est nécessaire *via* la nucléation de MTs à partir du complexe Augmin. De nombreuses protéines cruciales à son assemblage s'y relocalisent à partir du cytoplasme. Ainsi, des protéines motrices et des MAPs sont recrutées pour l'assemblage tandis que des kinases mitotiques sont relocalisées pour la régulation. Les composants clés de ce processus sont la MAP PRC1 (*protein regulator of cytokinesis 1*), le complexe centralspindlin (tétramère de deux KIF23 et deux RACGAP1) et le complexe CPC.

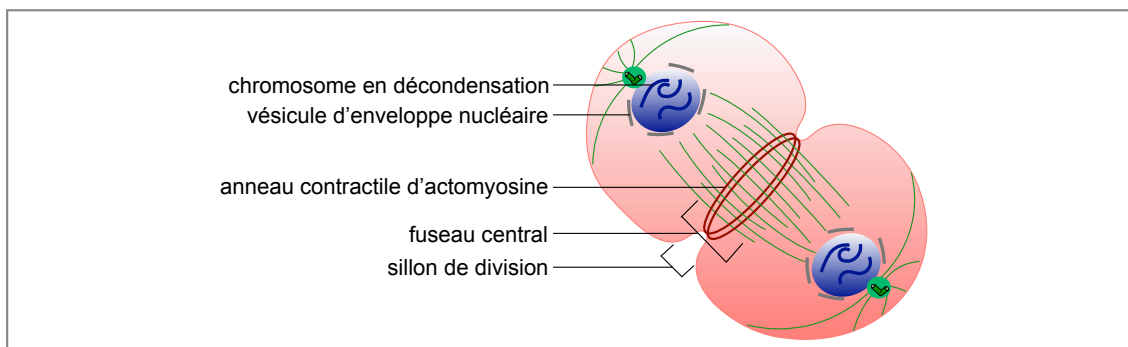


Figure 12 : La télaphase (d'après [6])

Représentation schématique d'une cellule eucaryote en télaphase. L'enveloppe nucléaire se reforme autour des chromosomes qui ont atteint les pôles et commencent à se décondenser. Le fuseau mitotique est désassemblé tandis que le fuseau central s'organise. Cette structure est essentielle à l'initiation du fuseau de division *via* la mise en place de l'anneau contractile d'actomyosine.

2.2.5. La télaphase

La mitose se termine en télaphase, l'étape pendant laquelle les chromosomes atteignent les pôles et où le fuseau mitotique se désassemble (Figure 12) [14]. Une enveloppe nucléaire se reforme à partir des vésicules de l'enveloppe originelle autour

de chaque lot de chromosomes séparés qui se décondensent. Pour permettre ces étapes, de nombreuses protéines qui régulent de la mitose sont déphosphorylées puis dégradées.

Le fuseau mitotique se désassemble mais le fuseau central continue son assemblage. Le fuseau central est essentiel à la régulation de l'initiation du sillon de division *via* la mise en place d'un anneau contractile d'actomyosine et est nécessaire à l'achèvement de la cytotédière.

Une étape importante du cycle du centrosome a également lieu pendant la télophase : le désengagement des centrioles (Figure 4 - i). Le lien entre les centrioles et les procentrioles est rompu, formant un nouveau centriole fille et donc un centrosome pour chaque cellule fille. Cette étape est indispensable à la duplication des centrosomes au cycle cellulaire suivant.

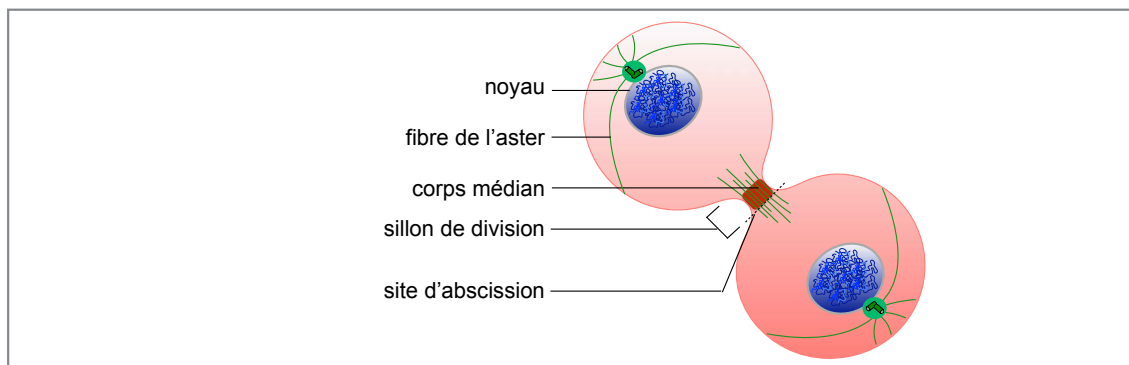


Figure 13 : La cytotédière (d'après [6])

Représentation schématique d'une cellule eucaryote en cytotédière. Le noyau est reformé et les chromosomes décondensés. La constriction de l'anneau contractile conduit à la compaction du fuseau central et la formation du corps médian qui concentre les protéines nécessaires à l'abscission.

2.2.6. La cytotédière

Une fois la mitose terminée les deux cellules filles doivent physiquement se séparer. La cytotédière dépend de l'activité de l'anneau contractile dont la constriction graduelle à partir de la fin de l'anaphase permet le pincement de la membrane plasmique provoquant un sillon de division entre les deux cellules filles (Figure 13) [14, 15].

L'anneau contractile est un réseau de filaments d'actine-myosine et de protéines qui s'assemblent sur la face interne de la membrane plasmique. L'assemblage de l'anneau se fait *via* l'activation coordonnée de l'activité des moteurs de myosine et la polymérisation des filaments d'actine. C'est la petite GTPase RhoA qui coordonne cette activité en induisant la nucléation de l'actine en activant la myosine. Le fuseau

central contribue à la concentration de la forme active de RhoA, en régulant spatialement le facteur d'échange de la guanine ECT2. Comme pour la petite GTPase Ran, RhoA est activée lorsqu'elle lie la GTP et ECT2 catalyse le passage de la forme inactive RhoA-GDP à la forme active RhoA-GTP. La protéine RACGAP1 (*GTPase activating proteins - CYK-4*) du complexe centralspindlin participe à l'inactivation de RhoA en catalysant l'hydrolyse de la GTP.

La formation du sillon de division requiert, en plus de l'activité de l'anneau contractile, l'ajout de nouvelles membranes au même rythme que la contraction pour éviter sa rupture prématurée. La détermination du lieu de la formation du sillon de division est gouvernée par un mécanisme encore peu élucidé. En plus de la régulation de l'anneau contractile par RhoA *via* le fuseau central, des signaux sont émis à partir des fibres de l'aster [15]. Ces signaux causeraient soit une relaxation corticale au niveau des MTs astraux induisant la contraction à l'équateur de la cellule soit stimuleraient la contraction au niveau des zones de chevauchement entre les MTs astraux et ceux du fuseau central. Avec la progression du sillon de division, le fuseau central se compacte jusqu'à devenir une structure dense appelée corps médian. Le corps médian dirige l'abscission en concentrant un nombre important de protéines dont les protéines associées à la membrane qui constituent les complexes ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*). Ces protéines s'assemblent en un système filamentueux et conduisent à l'abscission au niveau d'un site adjacent au corps médian.

2.3. La phase G0 et la ciliogénèse

Après l'aboutissement de la cytodierèse, les cellules nouvellement formées peuvent soit continuer à se diviser ou stopper leur prolifération. La majorité des cellules humaines ne prolifèrent plus, elles entrent dans une phase appelée quiescente ou phase G0. La plupart des cellules en phase G0 possèdent une structure appelée le cil primaire (Figure 14) [16]. Cette structure est une protrusion de la cellule faite de MTs qui joue le rôle de centre sensoriel. Il transmet les signaux du milieu extérieur et permet la régulation de la prolifération cellulaire et du développement embryonnaire.

Pour mettre en place cette structure, le centrosome migre à la membrane et le centriole père s'ancre à la membrane pour former le corps basal du cil (*basal body*). Ainsi le centrosome passe d'un état de centre organisateur de microtubules à un état de corps basal. Le cil primaire est une structure en forme de doigt : il contient un squelette de neuf doublets de microtubules organisés en anneau et appelé axonème lié au corps basal et recouvert de membrane plasmique. Le cil mesure entre un et cinq micromètres de longueur et 0,2 micromètre de largeur.

Le cil primaire peut être considéré comme une structure post-mitotique. Ainsi la présence de centrioles en surnombre, en lien avec des défauts de mitose, entraîne la présence de plusieurs cils à la surface de la cellule. Les cellules avec des cils en surnombre présentent un phénotype dit de dilution des cils, réduisant les molécules de signalisation et conduisant à différents cancers.

La présence d'un cil primaire à la surface des cellules serait incompatible avec la division cellulaire. Le désassemblage du cil, le détachement et le retour à un centrosome de type « centre organisateur de microtubules » est nécessaire à la reprise du cycle cellulaire. Bien que la pensée dominante suggère que le cycle cellulaire régule les changements au sein des protéines du centrosomes, de récentes évidences suggèrent l'idée inverse : ce sont les changements au sein des protéines du centrosome qui régulent le cycle cellulaire [16].

Le cil primaire est une structure essentielle aux fonctions cellulaires et des défauts de cil sont associés à de nombreux syndromes cliniquement importants appelés ciliopathies comme les polykystoses rénales, les syndromes de Joubert, Meckel, d'Alström, Bardet-Biedl et la néphronoptise.

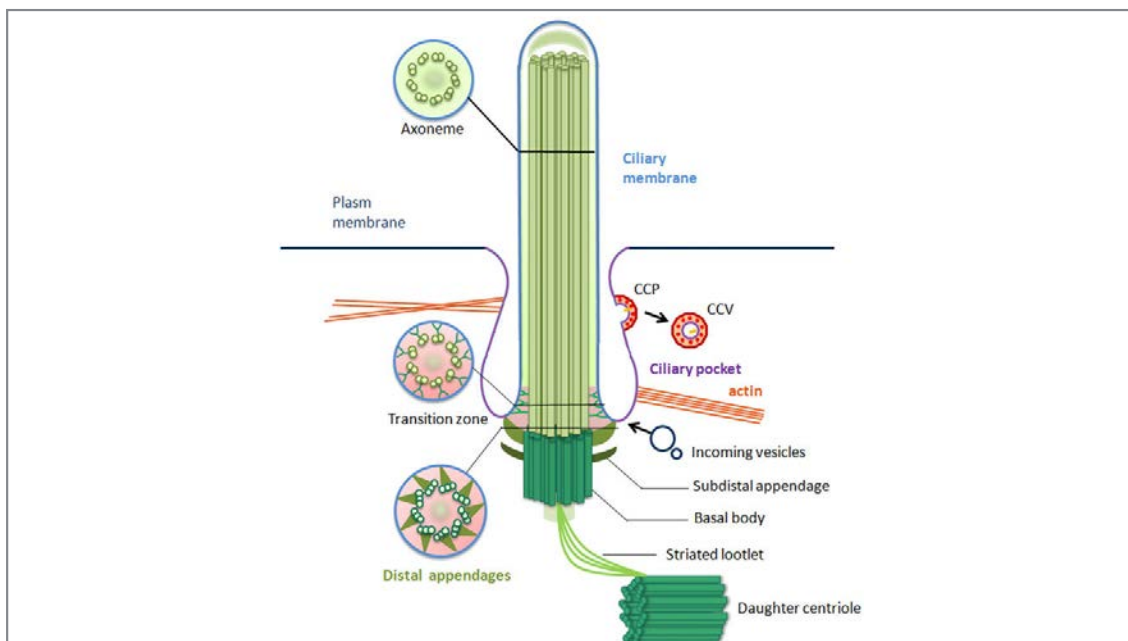


Figure 14 : Le cil primaire [16]

Représentation schématique du cil primaire. Le centriole père du centrosome s'ancre à la membrane pour former le corps basal du cil à partir duquel les microtubules sont nucléés et forment l'axonème qui est recouvert de membrane plasmique. Cette structure permet à la cellule de sonder son environnement et de transmettre les signaux du milieu extracellulaire.

2.4. Dérégulation et cancer

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire incontrôlée. Les cellules cancéreuses d'un tissu ne répondent plus aux signaux de prolifération intra et extra-cellulaires. Elles croissent, se divisent et échappent aux signaux de mort jusqu'à perdre leur adhésion au tissu et envahir les autres tissus de l'organisme [6].

Le développement d'une tumeur est un processus multi-étapes durant lequel les cellules acquièrent une série de mutations leur conférant un avantage compétitif par rapport au reste du tissu [17]. Des mutations permettant une croissance et une division non restreinte, l'inhibition de la différenciation et la fuite de la mort cellulaire sont les facteurs clés dans le développement d'un cancer. L'accumulation des mutations responsables du développement d'une tumeur se fait au cours du temps, c'est pourquoi le risque de cancer augmente avec l'âge et l'état prolifératif du tissu. Ces mutations peuvent être acquises lors de mutations somatiques et/ou être héritées d'un parent, diminuant ainsi ce laps de temps. En ce sens, le cancer est une maladie génétique et deux classes de gènes sont impliqués dans ce processus : les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs [18].

Les proto-oncogènes sont une classe de gènes qui, en temps normal, sont exprimés pour promouvoir la croissance et la division cellulaire. Les versions mutantes de ces gènes, généralement dominantes, favorisent la formation de tumeurs et sont appelés oncogènes.

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont une classe de gènes qui en temps normal inhibe la croissance, la division cellulaire et favorise la mort cellulaire. Les versions mutantes de ces gènes entraînent généralement une perte de fonction qui est génétiquement récessive. Ainsi les deux copies du gène (allèles) doivent être mutées pour promouvoir le développement d'un cancer.

Les mutations responsables du développement d'un cancer ne sont héritées que dans 5 à 10% des cas. Dans les 90% restants, il s'agit de mutations spontanées dues à des erreurs naturelles de duplication, réparation, ou ségrégation de l'ADN et des chromosomes.

Ainsi, l'instabilité génétique, une augmentation du taux de dommages, pertes ou réarrangement de l'ADN et des chromosomes, est un facteur clé dans le développement d'une tumeur. Dans la plupart des cas, cette instabilité génétique est issue de mutations des protéines régulatrices impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN et leur réparation, le contrôle du cycle cellulaire et de la mitose. Les cyclines, les protéines kinases cyclines-dépendantes et leurs substrats, les

phosphatases et les protéines suppresseurs de tumeurs p53 et Rb font partie des principales protéines impliquées dans la carcinogenèse.

3. La régulation du cycle cellulaire

Pour assurer le déroulement ordonné des différentes étapes du cycle, il existe un rigoureux système de contrôle du temps et de l'enchaînement des événements. Ce mécanisme repose principalement sur une famille d'enzymes appelées les protéines kinases cycline-dépendantes (CDKs) [6]. Tout au long du cycle, l'activité enzymatique des CDKs oscille et varie de manière abrupte en fonction de leur interaction avec des sous-unités régulatrices : les cyclines. Ces variations entraînent un changement dans l'état de phosphorylation d'un grand nombre de protéines régulatrices du cycle cellulaire. Ces phosphorylations modifient l'activité de ces protéines et initient différents événements du cycle comme la mise en place des points de contrôle. Les trois points de contrôle majeurs du cycle : G1/S, G2/M et métaphase-anaphase agissent comme des contrôles qualités biochimiques, ils permettent la progression du cycle, son ralentissement ou son arrêt en cas de défauts majeurs. Les défauts sont soit réparés et la progression du cycle reprend, soit trop importants pour être réparés et la cellule est éliminée par apoptose.

Pendant la mitose, en plus des CDKs, l'activité de trois grandes familles de kinases est capitale : les kinases Aurora, PLK et NEKs. Pour contrebalancer l'action de ces kinases, des phosphatases mitotiques sont également essentielles au bon déroulement de la mitose.

En fin de métaphase, le complexe CDK1-cycline B a complété ses principales fonctions. Il est inactivé et ses substrats sont déphosphorylés. La progression de la métaphase vers la fin du cycle dépend du protéasome, un système de dégradation de protéine qui contrôle la progression du cycle cellulaire. Avant d'être dirigées vers le protéasome, les protéines mitotiques sont ubiquitinées par le complexe de promotion de l'anaphase APC (*anaphase-promoting complex*). Ce complexe est une ubiquitine ligase qui catalyse entre autre l'ubiquitination de la securine et de la cycline B.

Les mécanismes qui permettent le contrôle du cycle cellulaire sont multiples et font intervenir la phosphorylation, la déphosphorylation et la dégradation spécifique des protéines régulatrices du cycle cellulaire.

3.1. Les mécanismes de régulation

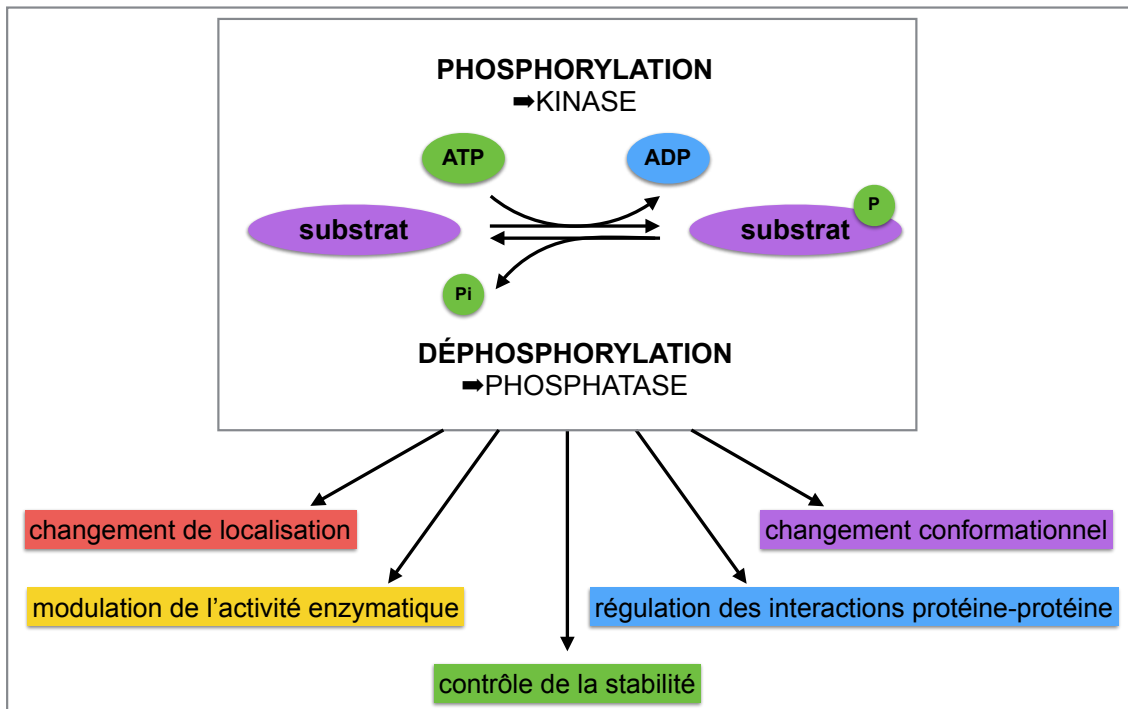


Figure 15 : Le principe de la phosphorylation et la déphosphorylation

Représentation schématique du principe de phosphorylation et déphosphorylation : les kinases catalysent le transfert réversible d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP vers un substrat tandis que les phosphatases catalysent l'hydrolyse de ce groupement. Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles à la régulation de l'activité des substrats.

3.1.1. La phosphorylation

La phosphorylation est la modification rapide et réversible d'une protéine *via* l'attachement covalent d'un groupement phosphate sur un ou plusieurs de ses acides aminés. Il existe deux familles d'enzymes qui catalysent cette réaction, les tyrosine kinases et les sérine/thréonine kinases. Le principe suivi par ces deux familles est le même : la kinase reconnaît une séquence spécifique d'acides aminés présentant le résidu d'intérêt et catalyse le transfert d'un groupement phosphate labile de l'ATP (adénosine triphosphate) et son attachement covalent la chaîne latérale du résidu ciblé. Cette modification dynamique de la protéine substrat peut entraîner son changement de conformation, stabiliser ou déstabiliser la protéine, déclencher ou inhiber son activité enzymatique, modifier sa localisation, promouvoir et/ou empêcher ses interactions avec d'autres protéines (Figure 15).

3.1.2. La déphosphorylation

Le phénomène inverse de la phosphorylation est appelé la déphosphorylation. Ce mécanisme est basé sur l'action enzymatique d'une classe d'enzymes spécifiques appelées les protéines phosphatases. Ces enzymes reconnaissent et catalysent l'hydrolyse du groupement phosphate de la protéine substrat.

La phosphorylation et la déphosphorylation sont souvent couplées et permettent une fine régulation d'un grand nombre de processus biologiques (Figure 15).

3.1.3. La protéolyse ubiquitine dépendante

L'ubiquitine est une petite protéine régulatrice qui est attachée de manière covalente aux résidus lysines des protéines substrats. Cette modification post-traductionnelle est appelée l'ubiquitination et requiert l'enchaînement de trois réactions : (Figure 16)

1- L'activation de l'ubiquitine par l'enzyme E1 : l'ubiquitine est chargée sur l'enzyme E1 *via* l'hydrolyse de l'ATP

2- La conjugaison de l'ubiquitine par l'enzyme E2 : l'ubiquitine active est transférée de l'enzyme E1 sur une enzyme de la famille des enzymes conjugantes E2

3- Le transfert de l'ubiquitine sur la protéine substrat *via* l'enzyme E3 : l'ubiquitine de l'enzyme E2 est transférée vers les résidus lysines de la protéine cible grâce à l'activité d'une ubiquitine-ligase ou enzyme E3.

À ce jour, le génome humain code pour 2 enzymes E1, au moins 35 enzymes E2 et environ 600 enzymes E3.

Les protéines cibles peuvent être mono-ubiquitinées : une seule molécule d'ubiquitine est ajoutée ce qui peut modifier leur localisation ou leurs interactions protéine-protéine. Les substrats peuvent également être poly-ubiquitinés : plusieurs molécules d'ubiquitines sont ajoutées sur un ou plusieurs résidus lysines de la protéine cible. En fonction de la topologie de la chaîne d'ubiquitine, les protéines cibles ont leurs interactions protéine-protéine modifiées ou sont orientées vers le protéasome. Le protéasome est un complexe enzymatique, multiprotéique, responsable de la protéolyse des protéines ubiquitinées et donc de leur dégradation.

Ce processus de dégradation spécifique est un processus important dans la régulation du cycle cellulaire [19-21].

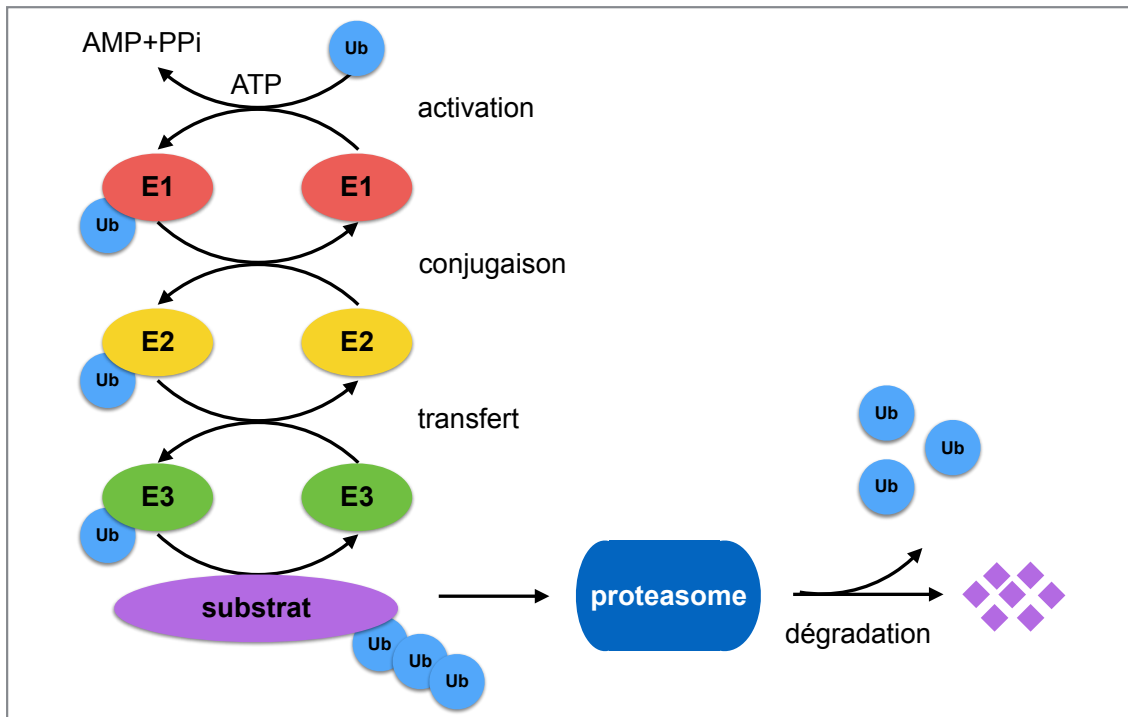


Figure 16 : La protéolyse ubiquitine dépendante

Représentation schématique du principe de la protéolyse ubiquitine dépendante : des molécules d'ubiquitines sont transférées sur un substrat *via* l'enchaînement de l'activité des enzymes E1, E2, E3. La chaîne de polyubiquitine est reconnue par le protéasome qui dégrade le substrat.

3.2. Les protéines majeures du cycle cellulaire

3.2.1. Les CDKs

Les kinases cycline-dépendantes, sont une famille de sérine/thréonine kinases [22, 23]. Elles sont exprimées de manière globalement constante dans la cellule mais leur particularité réside dans le système de contrôle de leur activité catalytique. Les CDKs ne sont actives que lorsqu'elles sont en interaction avec des protéines régulatrices appelées cyclines (Figure 17 - B) [24, 25] Les cyclines sont synthétisées et détruites à des moments spécifiques du cycle cellulaire. L'activité des CDKs est donc régulée de manière temporelle en fonction du moment et de la quantité de cyclines synthétisées au cours du cycle cellulaire. Les oscillations de l'activité des CDKs sont principalement contrôlées par la synthèse et la dégradation des cyclines (Figure 17A) [26, 27].

Les cellules humaines expriment 20 CDKs, nommées CDKs 1 à 20, et 29 cyclines. Les CDKs peuvent être divisées en deux groupes, les CDKs, activées par une seule cycline, impliquées dans la régulation de la transcription et les CDKs activées par plusieurs cyclines, impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

Seul un nombre restreint de complexes CDK-cycline est en lien direct avec le système

de contrôle du cycle cellulaire : les CDKs interphasiques 2, 4 et 6, la CDK mitotique CDK1 et dix cyclines réparties en 4 types A, B, D et E.

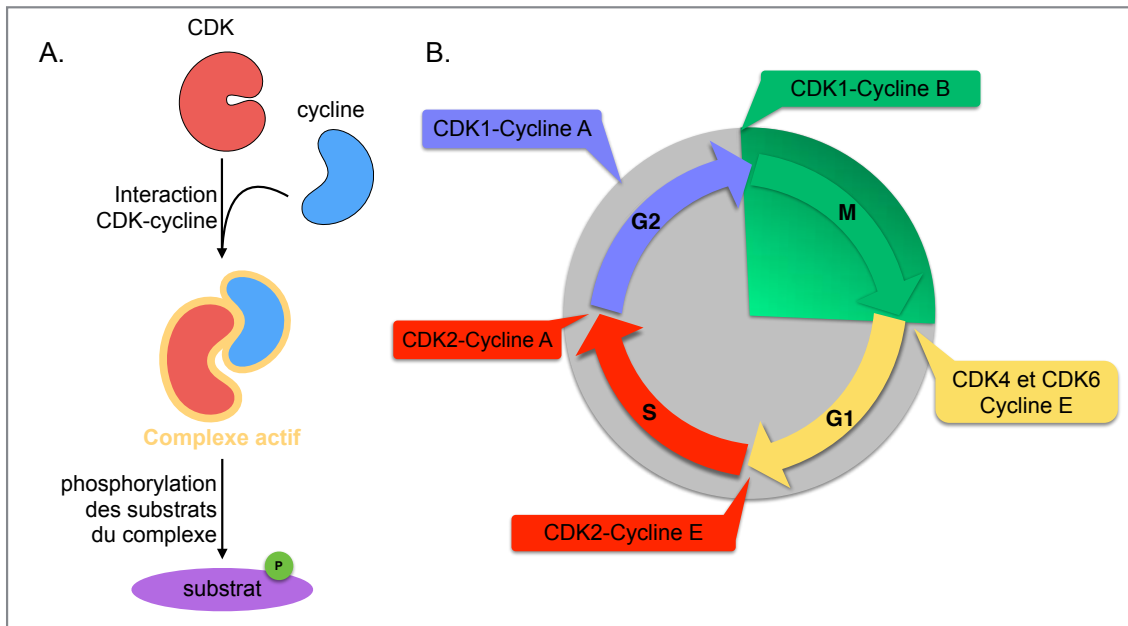


Figure 17 : L'activation des kinases cycline-dépendantes au cours du cycle cellulaire (d'après [6])

A - Représentation schématique du principe d'activation des CDKs. La liaison entre une CDK et une cycline permet la formation d'un complexe actif capable de phosphoryler spécifiquement leurs substrats.

B - Représentation schématique de l'implication des différents complexes de CDK-cycline qui interviennent au cours du cycle cellulaire. L'action des complexes Cdk4-cycline E et Cdk6-cycline 6 favorise l'entrée des cellules en phase G1. L'activité du complexe Cdk2-cycline E permet le passage du point de contrôle G1/S. L'activité du complexe Cdk2-cycline A et Cdk1-cycline A joue un rôle dans l'achèvement de la phase S et la cycline A est dégradée en phase G2. Le complexe CDK1-cycline B est essentiel à l'entrée en mitose et son inactivation *via* la dégradation de la cycline B est nécessaire à la sortie de mitose.

3.2.1.1. Les kinases cycline-dépendantes interphasiques CDK2, CDK4 et CDK6 :

Chez l'adulte la plupart des cellules sont quiescentes et expriment peu de gènes du cycle cellulaire. Cette répression est principalement due à la protéine du rétinoblastome (Rb) qui séquestre des facteurs de transcription tel que E2F et recrute des complexes de la répression de la transcription. Sous l'effet de signaux extracellulaires mitogènes, les cyclines de type D sont produites, elles se lient et activent les protéines CDK4 et CDK6. Les complexes CDK4-cycline D et CDK6-cycline D phosphorylent RB entraînant l'inactivation de la répression de la transcription. Cette phosphorylation permet ainsi une transcription massive des gènes du cycle cellulaire, c'est le début de la phase G1.

Les cyclines de type E font partie des cibles majeures réprimées par le complexe RB-

E2F. Les complexes CDK4-cycline D et CDK6-cycline D permettent la transcription et la stabilisation des cyclines de type E qui se lient à la protéine CDK2. Le complexe actif CDK2-cycline E phosphoryle également la protéine RB inhibant son rôle de répresseur de la transcription, indépendamment de la présence de facteurs mitogènes. Le complexe CDK2-cycline E permet le passage du point restriction et déclenche l'entrée en phase S avec l'initiation de la réplication de l'ADN. Le complexe CDK2-cycline E possède un large spectre de substrats et phosphoryle de nombreuses autres protéines impliquées, notamment, dans la modification des histones, la maturation et la duplication des centrosomes. Pour éviter une seconde réplication de l'ADN, la cycline E est rapidement dégradée une fois la cellule entrée en phase S. Les cyclines de types A et B, produites suite à l'inactivation de la protéine RB par le complexe CDK2-cycline E, prennent le relai. Le complexe CDK2-cycline A est responsable de la phosphorylation de protéines nécessaires à l'achèvement et la sortie de la phase S comme des protéines impliquées dans la régulation de la cycline A, la réplication et la réparation de l'ADN, les modifications des histones, la protéolyse ubiquitine-dépendante et la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire.

Ce modèle classique de régulation de l'interphase par les CDKs 4, 6 et 2 a été remis en question chez la souris par des expériences d'inactivation génique (*Knock-out*: KO). Il s'avère que l'absence d'une CDK n'entraîne pas l'utilisation d'une autre indiquant une redondance et une souplesse dans les fonctions de chaque CDK et leur association aux cyclines. Les expérimentations ont été poussées très loin puisque l'absence simultanée des CDK 4, 6 et 2 n'empêche pas la division cellulaire. Seule la protéine kinase CDK1 est essentielle et suffisante pour conduire le cycle cellulaire de tous les types cellulaires au moins jusqu'en mi-gestation [23].

3.2.1.2. La kinase cycline-dépendante mitotique CDK1 :

La protéine CDK1 s'associe également à la cycline A et le complexe CDK1-cycline A partage un nombre important des substrats du complexe CDK2-Cycline A comme les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN et le contrôle de la progression du cycle cellulaire. En phase G2, les cyclines de type A sont dégradées pendant que les cyclines de type B sont activement synthétisées. Les protéines CDK1 se lient ainsi aux cyclines de type B et cette association est essentielle à l'entrée en mitose. Le complexe CDK1-cycline B est responsable de la phosphorylation de plus de 70 substrats lors des phases G2 et M. Il joue notamment un rôle, lors de la prophase, dans la condensation des chromosomes, la fragmentation de l'appareil de Golgi et la rupture de l'enveloppe nucléaire. En métaphase, le complexe CDK1-cycline B

phosphoryle l'APC ce qui augmente l'interaction avec sa protéine activatrice CDC20 et déclenche la ségrégation des chromatides-soeurs : c'est l'anaphase. Pour sortir de mitose, le complexe CDK1-cycline B est inactivé suite à la dégradation de la cycline B par le complexe APC-CDC20 et ses substrats sont déphosphorylés par les phosphatases mitotiques.

3.2.2. Le Complexe de Promotion de l'Anaphase - APC

Le complexe protéique APC est une ubiquitine-ligase activée à la transition métaphase-anaphase et nécessaire à la sortie de mitose qui assure la ségrégation correcte des chromosomes [6, 19, 21].

Chez les vertébrés, l'APC est un complexe protéique, comprenant 19 sous-unités organisées en trois domaines structuraux : le coeur catalytique, la plateforme qui fait le pont avec le lobe TPR (*Tetratricopeptide repeat*) où se lient les protéines régulatrices. Lors de la mitose, l'APC coopère avec au moins deux enzymes E2 : UBE2C qui permet de liaison avec la première ubiquitine et UBE2S qui catalyse l'élongation de la chaîne d'ubiquitine. APC est peu actif sans co-activateur. En mitose, les deux protéines activatrices principales sont CDC20 et CDH1 : grâce à leur domaine de liaison WD40, elles permettent le recrutement des substrats de l'APC et améliorent l'interaction avec les enzymes E2.

CDC20 s'associe avec l'APC phosphorylé conduisant à la dégradation des substrats de la prométaphase et la métaphase. Entres autres, le complexe APC-CDC20 cible et déclenche la dégradation de la sécurine et de la cycline B.

La dégradation de la sécurine libère la séparase, une protéase, qui clive les complexes cohésine et permet la séparation synchronisée des chromatides-soeurs en anaphase.

La dégradation de la cycline B inactive la CDK1, ses substrats sont déphosphorylés ce qui permet la poursuite du cycle cellulaire avec la cytotélerèse et la sortie de mitose. L'inactivation de CDK1 entraîne également la déphosphorylation de CDH1 qui peut se lier et activer l'APC. Le complexe APC-CDH1 entraîne la dégradation de protéines régulatrices de la mitose telles que CDC20 et les protéines kinases PLK et Aurora. Ces dégradations sont nécessaires à l'achèvement de la cytotélerèse et la sortie de mitose.

3.2.3. Les phosphatases mitotiques

Le contrôle spatio-temporel des événements mitotiques est majoritairement régulé par les phosphorylations réversibles des protéines régulatrices clés de la mitose. La déphosphorylation de ces protéines est aussi cruciale que leur phosphorylation dans le déroulement du cycle cellulaire [28-31].

Le génome humain contient 150 gènes codant pour des sous-unités catalytiques de protéines phosphatases et parmi-eux, seule une quarantaine encodent pour des sérines/thréonines phosphatases.

Les sérines/thréonines phosphatases présentent une activité constitutive moins spécifique que celle des kinases. La régulation de leur activité repose sur la large gamme de sous-unités régulatrices qui s'associent à la sous-unité catalytique et modulent sa spécificité de substrat, sa localisation et son activité globale. Ainsi le nombre d'holoenzymes possiblement formées s'équilibre avec le nombre de sérines/thréonines kinases (426 sur 518 gènes de kinases codent pour des sérines/thréonines kinases).

Les sérines/thréonines phosphatases qu'on retrouve le plus abondamment dans les cellules animales sont les phosphatases PP1 et PP2A. Ces phosphatases appartiennent à la superfamille PPP qui comprend en plus la calcineurine, PP4, PP5, PP6 et PP7. À ce jour, les études ont montrées que seules les isoformes de PP1, PP2A, et PP6 sont impliquées dans le contrôle de la mitose [31].

En plus des sérines/thréonines phosphatases, il existe des phosphatases doubles spécifiques qui catalysent l'hydrolyse du groupement phosphate des résidus tyrosines et sérines/thréonines. Parmi ces phosphatases doubles spécifiques, seules les isoformes des phosphatases CDC25 et CDC14 présentent des fonctions mitotiques.

3.2.3.1. Cell Division Cycle 25 - CDC25

CDC25 est une phosphatase double spécifique et trois isoformes ont été identifiées chez les mammifères : CDC25 A, CDC25B et CDC25C [32-34]. Leur domaine catalytique est bien conservé contrairement aux régions régulatrices qui contrôlent leur localisation intracellulaire et leur dégradation.

L'activité de la phosphatase CDC25 est nécessaire dès l'entrée en mitose [35]. En effet, le complexe CDK1-cyclineB est maintenu inactif par les kinases de la famille WEE1 (Wee1 et Myt1) qui phosphorylent deux sites inhibiteurs de la boucle d'activation de CDK1 (Thr14 et Tyr15). Lors de l'entrée en mitose, CDC25 déphosphoryle ces deux résidus et permet l'activation du complexe CDK1-cyclineB [24].

CDC25 est également régulée sur plusieurs niveaux [36]. Durant l'interphase, CDC25 est gardée inactive *via* la phosphorylation inhibitrice de son résidu ser216 et son association avec les protéines 14-3-3 qui empêchent son activité catalytique et la séquestre dans le cytoplasme. La déphosphorylation du résidu ser216 implique l'activité de la phosphatase PP1 qui se lie directement à CDC25 tandis que le

mécanisme de dissociation des protéines 14-3-3 implique l'activité de la phosphatase PP2A.

3.2.3.2. Sérine/thréonine phosphatase protéine 2A - PP2A

PP2A est une holoenzyme hétérotrimérique composée d'un coeur dimérique formé d'une sous-unité échafaudage A et d'une sous-unité catalytique C auquel vient s'ajouter une sous-unité régulatrice B [29, 37].

Les sous-unités A et C ont deux isoformes chacune. La sous-unité B est le déterminant majeur dans la spécificité de substrat et la localisation cellulaire. À ce jour, il existe 20 sous-unités B réparties en 4 familles : B, B', B'' et B'''. Les combinaisons de ces différentes sous-unités et autres protéines régulatrices permettent d'obtenir plus d'une centaine de complexes protéiques distincts.

Les complexes PP2A interviennent dès la phase S lorsque la réplication de l'ADN n'est pas terminée et que les dommages à l'ADN ne sont pas réparés. Ainsi la phosphatase PP2A permet de maintenir CDC25 et PLK1 inactifs et d'inhiber l'activation du complexe CDK1-cyclineB, ce qui retarde l'entrée en mitose.

PP2A joue un rôle essentiel en sortie de mitose notamment en déphosphorylant les substrats du complexe CDK1-cyclinB. PP2A contre également la kinase mitotique PLK1 au niveau des centromères pour le maintien de la cohésion jusqu'en anaphase. De plus, elle entraîne la dégradation de la kinase Aurora A *via* le complexe APC, nécessaire à la sortie de mitose, en déphosphorylant son résidu ser51.

Ainsi PP2A joue un rôle dans le désassemblage du fuseau mitotique, la décondensation de la chromatine et le réassemblage de l'enveloppe nucléaire et de l'appareil de Golgi.

3.2.3.3. Sérine/thréonine phosphatase protéine 1 - PP1

PP1 est une des phosphatases cellulaires les plus abondantes qui régule un grand nombre de processus comme le métabolisme du glycogène, la transcription, la polarité cellulaire, le trafic vésiculaire, la réponse aux dommages à l'ADN et la progression du cycle cellulaire [29, 38].

PP1 est une holoenzyme hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. Chez les mammifères, les sous-unités catalytiques sont encodées par trois gènes (PP1A, PP1B, PP1G). Environ 180 sous-unités régulatrices ont été identifiées. Elles permettent de déterminer la spécificité de substrat, la localisation cellulaire et/ou l'activité phosphatase [29].

PP1 participe à la régulation de l'entrée en mitose. En se liant avec la phosphatase

CDC25, elle déphosphoryle sa phosphorylation inhibitrice, ce qui permet l'activation du complexe CDK1-cycline B.

PP1 est également importante pour la sortie de mitose, bien qu'elle ne déphosphoryle pas directement les substrats de CDK1-cycline B, elle déphosphoryle les substrats d'autres kinases mitotiques. Ainsi, il a été montré que PP1 contre l'action des kinases Aurora à différents niveaux.

PP1 s'oppose directement et indirectement à Aurora A. De manière directe, PP1 déphosphoryle la thr288 de la boucle d'activation d'Aurora A humaine ce qui inhibe son activité kinase. De manière indirecte, PP1 déphosphoryle les substrats d'Aurora A comme PLK1 pour la maintenir inactive.

Localisée aux kinétochores, PP1 joue un rôle avec Aurora B dans le contrôle de l'attachement bipolaire des microtubules aux kinétochores. PP1 contre les phosphorylations des substrats d'Aurora B et réduit la phosphorylation activatrice de sa boucle d'activation tandis qu'Aurora B inhibe PP1 en phosphorylant ses partenaires KNL1 et CENPE responsables de sa localisation aux kinétochores. Aurora B soutient l'activation du SAC tandis que PP1 l'inhibe. PP1 et Aurora B s'opposent également sur les bras des chromosomes *via* la déphosphorylation de l'histone H3.

3.2.3.4. Sérine/thréonine phosphatase protéine 6 - PP6

Comme PP2A, PP6 est une holoenzyme hétérotrimérique comprenant la sous-unité catalytique PP6C, une sous-unité régulatrice SAPS1-3 (PP6R1-3) et une sous-unité plateforme ANKRD28,44,52 (*ankyrin repeat domain protein*) [39, 40]. Localisée dans le cytoplasme, cette phosphatase joue un rôle dans la régulation de NF-kappaB, DNA-PK (*DNA-dependant protein kinase*), histone γ -H2AX et Aurora A. PP6 est la principale phosphatase de la thr288 de la boucle d'activation d'Aurora A. Ainsi en mitose Aurora A phosphorylée, en complexe avec son activateur TPX2, est le principal substrat de la phosphatase PP6. La déplétion des sous-unités catalytiques ou régulatrices de PP6 interfère avec l'assemblage du fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes en lien avec une activité d'Aurora A non contrôlée.

3.2.4. Les kinases mitotiques

Avec les kinases cyclines-dépendantes, trois autres familles de kinases sont hautement impliquées dans la régulation de la mitose, les kinases Aurora, PLKs et NEKs.

3.2.4.1. Les kinases de la famille Aurora

Les kinases Aurora qui jouent un rôle majeur dans le déroulement et le contrôle de la mitose, regroupent chez les vertébrés trois protéines distinctes : les kinases Aurora A, B et C.

La kinase Aurora A et l'analyse de ses partenaires protéiques étant le sujet de ma thèse, je consacre le chapitre 4 au détail de cette famille.

3.2.4.2. Les polo-like kinases

La famille des PLKs regroupe également plusieurs protéines. Ainsi chez les vertébrés on retrouve cinq kinases : les sérine/thréonine kinases PLK 1 à 5. Une caractéristique importante, spécifique de cette famille, est la présence dans leur structure de boîtes polo (polo boxes). Ces motifs sont organisés dans différentes configurations et régulent l'activité, les localisations et les fonctions des PLK [41, 42].

Le membre le plus étudié de la famille est la kinase PLK1. Elle participe à un grand nombre d'événements au cours du cycle cellulaire et plus particulièrement lors de la phase mitotique. PLK1 fait partie de la boucle d'activation positive du complexe CDK1-cyclinB dans le processus du contrôle de l'entrée en mitose. Elle est requise lors de la reprise de ce processus après un arrêt du cycle suite à des dommages à l'ADN. PLK1 est également impliquée dans la coordination entre le cycle cellulaire et le cycle du centrosome en participant notamment au désengagement des centrioles, la disjonction, séparation et la maturation des centrosomes. Enfin, PLK1 joue un rôle dans l'assemblage du fuseau mitotique, la ségrégation des chromosomes, la sortie de mitose et la cytodierèse.

Les autres PLKs sont moins étudiées. Il a été mis en évidence que PLK4 joue un rôle majeur dans le contrôle de la duplication des centrioles. PLK2, 3 et 5 sont principalement exprimées dans les cellules des tissus non prolifératifs. PLK3 est requise pour la transition G1/S et promeut la réplication de l'ADN, tandis que PLK2 et 5 sont impliquées dans l'activité neurale.

3.2.4.3. Les kinases NEKs

En plus des kinases Aurora et PLK, une troisième famille de kinases, est impliquée dans la régulation de la mitose, ce sont les NEKs (*NIMA-related kinases*). Le membre fondateur de cette famille est la protéine NIMA (*never-in-mitosis A*) de l'*Aspergillus nidulans* identifiée en 1983 lors d'une analyse génétique de mutants présentant des défauts du cycle cellulaire [43]. Dans ce champignon, la perte de fonction de la protéine NIMA entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G2; cette protéine étant essentielle à l'entrée en mitose [44, 45].

Chez l'Homme, la famille des protéines NEKs regroupe 11 sérine-thréonines kinases appelées NEK1 à NEK11 [46]. Ces onze kinases jouent un rôle principalement dans 3 fonctions clés : la régulation du cycle cellulaire, la biogenèse du cil primaire et la réponse aux dommages à l'ADN.

Bien qu'aucune de ces onze protéines kinases ne soit absolument requise pour l'entrée en mitose, les NEKs 2, 6, 7 et 9 jouent un rôle dans différentes étapes de la mitose. La kinase NEK2, structurellement la plus proche de NIMA, est un composant clé du centrosome. Elle contribue à la séparation des centrosomes *via* le désassemblage du lien entre les centrioles lors de l'entrée en mitose. Les kinases NEKs 6, 7 et 9 contribuent à la mise en place du fuseau mitotique. NEK9 lie et active NEK 6 et 7 et la perte d'une de ces trois protéines conduit à la formation d'un fuseau mitotique présentant une réduction de la densité de microtubules et une longueur plus courte. La séparation des centrosomes en prophase est également affectée et ces changements entraînent l'activation du SAC et l'arrêt du cycle cellulaire.

Les NEK 1 et 11 sont impliquées dans le point de contrôle G2/M *via* la détection et la réparation des cassures doubles brins d'ADN.

Les NEKs ont également un rôle dans l'assemblage et/ou les fonctions du cil primaire. Ainsi, des mutations de NEKs 1 et 8 conduisent à des ciliopathies et NEK7 soutiendrait la régulation du cycle du centrosome.

4. Aurora A

4.1. La famille de kinase Aurora

Le membre fondateur de la famille des kinases Aurora, Ipl1 (*increase-in-ploidy 1*), a été découvert en 1993 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* lors d'une analyse des gènes impliqués dans des défauts de ségrégation des chromosomes [47, 48]. De manière indépendante, des homologues d'Ipl1 ont été identifiés par différents groupes de recherche dans des études du cycle cellulaire; Aurora chez la drosophile *Drosophila melanogaster* [49] et Eg2 chez le xénope *Xenopus laevis* [50].

Chez les levures, un seul représentant de la famille Aurora est connu, il diverge en 2 kinases, Aurora A et Aurora B chez la drosophile, le xénope et le vers *C. elegans*. Chez les mammifères, il existe une troisième kinase, Aurora C qui dérive d'Aurora B. Ces trois sérine/thréonine kinases présentent des fonctions essentielles lors de la mitose et de la méiose [48].

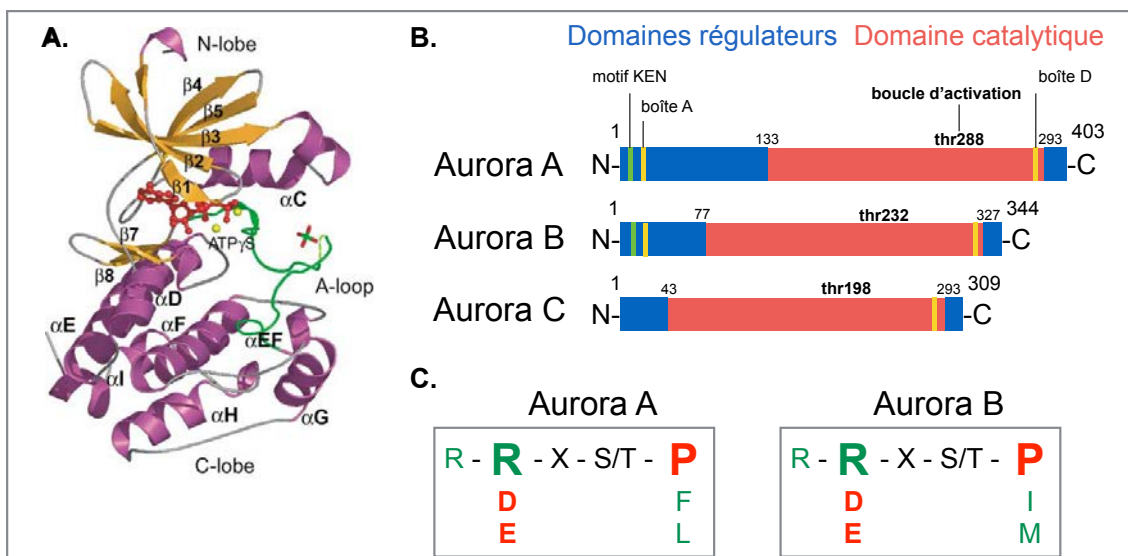


Figure 18 : Structure des kinases Aurora ([59] et d'après [51])

A - Diagramme en ruban de la structure d'Aurora A : en violet, les hélices α ; en orange, les feuillets β ; en vert, la boucle d'activation; en jaune, les ions cofacteurs Mg^{2+} , en rouge, l'ATP. B - Schéma des domaines des protéines Aurora : les domaines régulateurs sont en position N- et C- terminales et contiennent une boîte de destruction. Aurora A et B ont en plus un motif KEN et une boîte A en position N-terminale. Le domaine kinase en rouge contient une boucle d'activation spécifiquement phosphorylée au niveau du résidu thréonine clé.

C - Motifs de phosphorylation consensus des kinases Aurora A et B : en vert, les résidus préférés; en rouge, les résidus discriminés. Aurora A et B présentent toutes deux une forte préférence pour un résidu arginine en position -2, une forte discrimination pour un résidu proline en position +1, des préférences pour un second résidu arginine en position -3 et des résidus hydrophobes en position +1. Elles n'ont pas de sélectivité pour le résidu en position -1 (le X étant n'importe quel AA).

4.2. Structure des kinases Aurora

Chez l'Homme, les kinases de la famille Aurora ont des séquences protéiques très similaires. Elles sont composées d'un domaine régulateur N-terminal (de 43 à 133 résidus), un domaine catalytique : le domaine kinase hautement conservé (70% d'homologie entre Aurora A et Aurora B) et une partie C-terminal (entre 16 et 20 résidus). Le domaine régulateur en position N-terminal est responsable des interactions protéine-protéine unique de chaque kinase Aurora, il diffère par sa longueur et est peu conservé [51-53]. (Figure 18 - B)

Aurora A est la plus longue des trois protéines avec 403 AA, Aurora B a 344 AA et Aurora C n'a que 309 AA. Cependant, la similarité fonctionnelle entre Aurora A et Aurora B est telle que le changement d'un seul acide aminé d'Aurora A, la glycine 198 en asparagine, convertit son activité qui devient comparable à celle d'Aurora B [54-56]. Structurellement, les kinases Aurora possèdent une boucle d'activation (*T-loop*) qui change de conformation lorsqu'elle est phosphorylée, permettant l'accès du substrat au site de liaison. Cette phosphorylation est localisée sur un résidu clé de la T-loop : la thr288 (Aurora A, AA 274-299), thr232 (Aurora B) et thr198 (Aurora C) [57, 58]. Lorsque ce résidu est phosphorylé, les deux lobes, N et C, de la protéine se replient pour aligner les résidus de la poche catalytique et permettre le transfert du groupement phosphate de l'ATP vers le substrat [59]. (Figure 18 - A)

Une boîte de destruction (boîte D, *D-Box*) en position C-terminal est présente chez les trois kinases. Aurora A et B ont en plus un motif de dégradation KEN et une boîte A (*D-box activating*) en N-terminal. Ces motifs sont responsables de la régulation de leur ubiquitination par l'APC suivie de leur dégradation par le protéasome en fin de mitose [60-62] (Figure 18 - B).

La sélectivité de substrat des kinases repose entre autre sur la reconnaissance d'un motif de phosphorylation : une séquence d'acides aminés spécifique à proximité du site de phosphorylation. Aurora A et B possèdent un motif consensus de phosphorylation très similaire caractérisé par une forte préférence pour un résidu arginine (Arg - R) en position -2 du site ser/thr phosphorylable. Inversement la présence, à cette position, de résidus à chaîne latérale acide (Acide aspartique et glutamique - Asp et Glu - D et E) compromet fortement la phosphorylation. En position ser/thr-3, Aurora A et B présentent une légère préférence pour un second résidu R. En position ser/Thr+1, les deux kinases sélectionnent des acides aminés hydrophobes, Aurora B présentant une légère préférence pour les résidus Isoleucine (Ile - I) et Méthionine (Met - M) tandis qu'Aurora A présente une préférence pour les résidus Phenylalanine (Phe - F) et Leucine (Leu - L). Les motifs présentant une Proline (Pro -

P) en position Ser/Thr+1 sont très fortement discriminés. Une sélection modeste pour certains résidus hydrophobes est présente pour les deux kinases en position Ser/Thr+2. La sélection pour des résidus particuliers au delà des positions +/- 2 est faible comparée à d'autres kinases mitotiques. Aurora A et B présentent donc le même motif de phosphorylation consensus : R-X-S/T-φ (X étant n'importe quel acide aminé et φ n'importe quel résidu hydrophobe excepté le résidu Proline) [63]. (Figure 18 - C)

La sélectivité de substrats entre Aurora A et Aurora B se fait donc principalement par la distribution, la localisation et les partenaires protéiques spécifiques de chaque kinase au sein de la cellule.

4.3. Localisations et fonctions mitotiques

Aurora A et Aurora B sont exprimées dans tous les types de tissus tandis qu'Aurora C est principalement exprimée dans les testicules. Leur transcription est régulée en fonction du cycle cellulaire. Les promoteurs des gènes Aurora A et Aurora B contiennent des séquences spécifiques (séquences CDE/CHR) nécessaires à la transcription en phase G2. Aurora C, encore peu étudiée, semble être principalement exprimée dans les cellules en méiose (Figure 19).

4.3.1. Aurora A - AURKA

En fin de phase S, lors de la duplication des centrosomes, Aurora A commence à s'accumuler significativement dans la matrice péricentriolaire et son activité augmente drastiquement pour l'entrée en mitose entre les phases G2 et M. Lors de la phase M, Aurora A est activée et localise toujours aux centrosomes tandis qu'une sous-population se propage le long des microtubules sur le fuseau mitotique en assemblage jusqu'à la plaque métaphasique. Lors de l'anaphase, on retrouve cette sous-population d'Aurora A sur le fuseau central jusqu'au corps médian lors de la cytotélerèse. Dès la dégradation de la cycline B et l'inactivation de CDK1, Aurora A est inactivée par les phosphatases et est dégradée en fin de mitose jusqu'en début de phase G1. En interphase, une sous-population restreinte d'Aurora A reste détectable aux centrosomes (Figure 19) [64].

De part sa localisation, Aurora A remplit des fonctions majeures dans le déroulement du cycle cellulaire et plus particulièrement la mitose. Aurora A joue un rôle dès la phase S dans la disjonction et la maturation des centrosomes [49, 65]. La kinase participe au contrôle de l'entrée en mitose, l'assemblage du fuseau mitotique bipolaire, du fuseau central, l'alignement des chromosomes et l'achèvement de la cytotélerèse [50].

En aparté de ses fonctions mitotiques, des études récentes montrent qu'Aurora A joue un rôle en dehors de la mitose dans des processus cellulaires variés [66, 67].

Pour plus de clarté, les fonctions mitotiques et non mitotiques d'Aurora A sont détaillées dans la partie suivante.

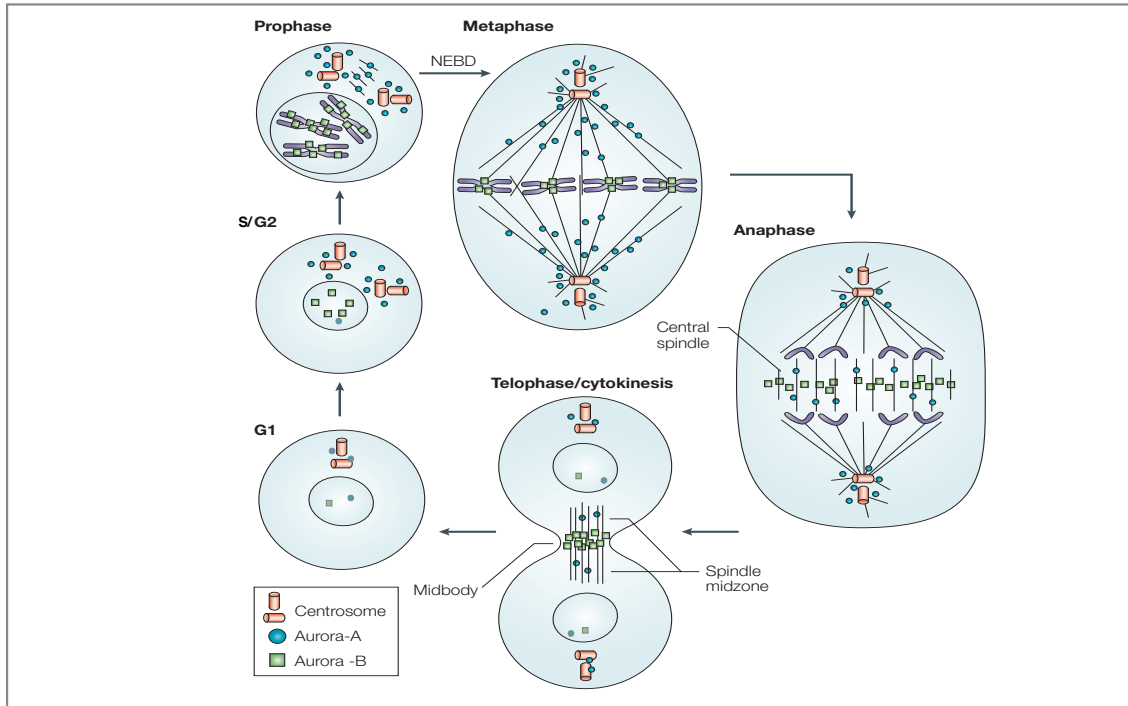


Figure 19 : Localisation des kinases Aurora A au cours du cycle cellulaire (adaptée depuis [64])

Représentation schématique de la localisation des kinases Aurora A et B au cours du cycle cellulaire : en interphase, on retrouve Aurora A au niveau des centrosomes et du noyau tandis qu'Aurora B localise au niveau du noyau. En mitose, Aurora A localise au niveau des centrosomes, une sous-population se localise sur le fuseau mitotique en métaphase puis le fuseau central en anaphase pour finir sur le fuseau central et le corps médian en fin de mitose. Aurora B localise au niveau des chromosomes dans le noyau puis sur leurs kinétochores lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD), elle relocalise sur le fuseau central puis le corps médian en fin de mitose.

4.3.2. Aurora B - AURKB

Aurora B est le composant enzymatique du CPC (*Chromosomal Passenger Complex*) (Figure 20). Le CPC est un complexe protéique associé aux chromosomes de la prophase à la métaphase [68]. En anaphase, il se relocalise sur le corps médian dès la séparation des chromatides-soeurs. Ainsi, il est capable de réguler des événements chromosomiques et cytosquelettiques. En plus d'Aurora B, le CPC est composé de la protéine échafaudage INCENP (*inner centromère protein - INCENP*) et des protéines régulatrices Survivin (*Baculoviral Inhibitor of Apoptosis Protein repeat-containing protein 5 - BIRC5*) et Borealin (CDCA8). Ensembles, la Survivin et la Borealin se lient à la partie N-terminale de la protéine INCENP tandis qu'Aurora B interagit avec la partie

C-terminale. Les parties N- et C- terminales de INCENP sont séparées par une large région non-structurée qui contient notamment le motif de liaison de la HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) et des sites de phosphorylation reconnus par CDK1 (Figure 20 - A) [68].

La stabilité individuelle de chaque composant du CPC est dépendante des interactions protéine-protéine du CPC et la déplétion d'un des composants ou l'inhibition de la kinase Aurora B déclenche les mêmes phénotypes.

La localisation du CPC varie au cours du cycle cellulaire ce qui permet le contrôle spatio-temporel de la phosphorylation de ses substrats [69-73].

4.3.2.1. Interphase et début de mitose

Aurora B est exprimée dès la fin de phase S et est localisée dans le noyau sur l'hétérochromatine péricentromérique et à proximité du nucléole. Elle phosphoryle la ser10 de l'histone H3 jusqu'en fin phase G2 puis sa localisation devient plus diffuse sur la chromatine. En début de prophase, le complexe CPC est présent sur les bras chromosomiques et contribue à la résolution et au compactage des chromatides-soeurs.

Avec la progression de la mitose en prométaphase, le CPC se concentre sur la partie interne des centromères *via* l'interaction avec les histones H3 thr3 et H2A ser121 phosphorylés. L'activité d'Aurora B facilite le recrutement du CPC aux centromères et assure la bi-orientation des chromosomes grâce au processus d'erreur-correction qui entraîne le détachement des liaisons kinétochore-microtubule erronées.

Il existe différents types d'attachements erronés : ils peuvent être monotéliques, syntéliques et/ou mérotéliques. Un accrochage monotélique des microtubules correspond à la liaison d'un seul kinétochore à une chromatine-soeur de la paire. L'attachement est dit syntélique quand les kinétochores sont liés par des microtubules du même pôle. L'accrochage mérotélique correspond à la situation où le même kinétochore est lié à des microtubules émanant des deux pôles. La déplétion de la Borealin ou l'inhibition de la kinase Aurora B augmente drastiquement le nombre d'attachements mérothéliques et syntéliques. (Figure 20 - B)

Le kinétochore est un assemblage moléculaire constitué de plus de 80 protéines. Une partie de l'architecture protéique de cette structure est constituée par le réseau KMN (complexe Knl1, le complexe Mis12 et le complexe Ndc80) qui assure la liaison de l'ADN centromérique avec l'extrémité « plus » des MTs du fuseau. Aurora B régule la stabilité de ce réseau *via* la phosphorylation du complexe Ndc80 affaiblissant sa liaison avec les MTs. Elle phosphoryle également d'autres composants des complexes Knl1

et Mis12 et leurs partenaires exerçant ainsi un contrôle très fin de l'attachement kinétochore-microtubules.

De plus, Aurora B régule la localisation de MCAK au niveau des centromères ainsi que son activité de dépolymérisation des microtubules.

La présence d'Aurora B dans le complexe CPC assure l'activation et la maintenance du SAC *via* la déstabilisation des liaisons kinétochore-MTs mais également *via* le recrutement des composants clés du SAC. L'activité d'Aurora B déclenche le recrutement aux kinétochores des protéines Mad1, Mad2 (*Mitotic arrêts déficient 1 - 2*), Bub1, BubR1, et CENP-E.

4.3.2.2. Fin de mitose

Durant la transition métaphase-anaphase, le complexe CPC est transféré au niveau des MTs du fuseau central et du cortex équatorial, la région de la membrane plasmique où la machinerie de la cytotdiérèse est assemblée. Cette relocalisation est initiée par la diminution de l'activité du complexe CDK1-cyclin B et requiert l'activité d'Aurora B et des phosphatases.

Aurora B participe à la formation du fuseau central qui requiert l'action de plusieurs protéines : Prc1, la kinésine Kif4, et le complexe centralspindlin. Le complexe CPC est nécessaire à la localisation du complexe centralspindlin au fuseau central *via* la phosphorylation de KIF23 par Aurora B. Cette phosphorylation promeut l'accumulation du complexe centralspindlin, augmente son activité d'empaquetage des MTs stabilisant ainsi le fuseau central.

4.3.2.3. Cytodiérèse

En cytotdiérèse, le complexe CPC est localisé au niveau du cortex et du corps médian. Lors de cette étape, il y a assemblage et construction d'un anneau contractile équatorial composé entre-autres d'actine et de myosine. Le site d'assemblage de l'anneau et le moment de la constriction sont précisément coordonnés avec la ségrégation des chromosomes. Le complexe CPC joue un rôle dans la régulation de l'assemblage et des fonctions de l'anneau contractile et dans la régulation de l'abscission. Le CPC contribue à la maturation de l'anneau contractile en participant à la régulation de RhoA, une GTPase qui stimule la polymérisation de l'actine et l'activation de la myosine II. La présence du complexe centralspindlin grâce à l'action du CPC est nécessaire à la localisation et l'activation de RhoA. Aurora B pourrait empêcher l'assemblage prématuré de l'anneau *via* la phosphorylation inhibitrice de la protéine GEF-H1 empêchant le chargement et l'activation de RhoA sur la plaque

métaphasique.

Plus globalement, Aurora B joue un rôle sur les interactions entre différents composants du cytosquelette. Aurora B est connue pour phosphoryler la Septine 1, une protéine de filament, les kératines 8 et 18, des protéines associées au cytosquelette. Le CPC contribue à l'invagination du sillon de division en régulant l'assemblage des filaments intermédiaires.

L'abscission est la dernière étape de la cytotélerèse. Aurora B est impliquée dans le point de contrôle qui retarde l'abscission en présence de chromosomes tardifs présents dans le pont intercellulaire : le site de division. Ce point de contrôle de l'abscission empêche la rupture des chromosomes et la tétraploïdisation des cellules. Ce mécanisme reste encore peu connu.

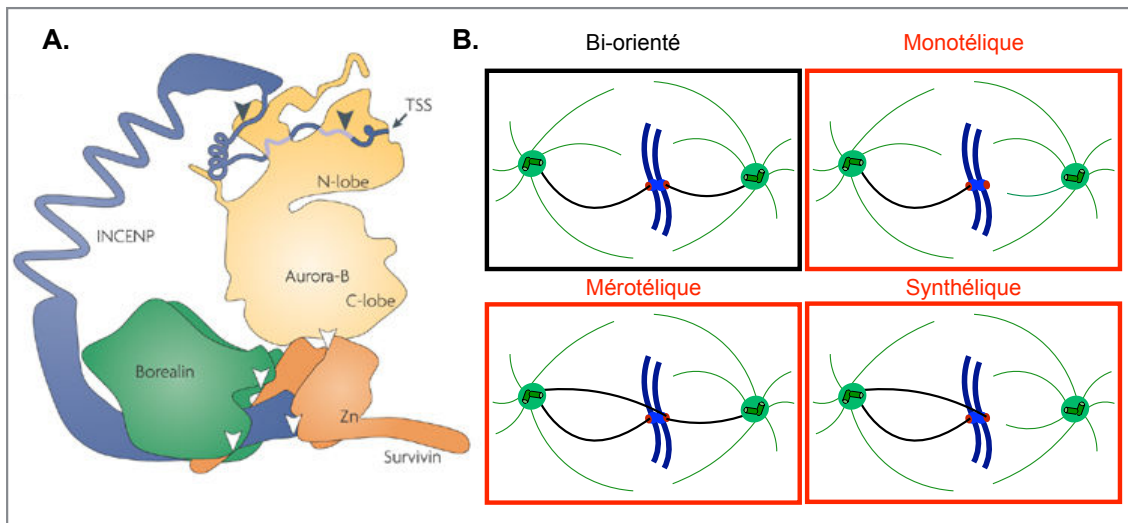


Figure 20 : Aurora B et ses fonctions (A- [68])

A - Représentation schématique du complexe CPC : la borealin et la survivin interagissent avec la partie N-terminale de la protéine INCENP tandis qu'Aurora B interagit avec sa partie C-terminale. B - Schéma des attachements kinétochore-microtubule : pour une ségrégation correcte, les chromosomes doivent être bi-orientés. Aurora B dans le complexe CPC participe à la correction des attachements erronés : les attachements monotéliques : un seul kinétochore est attaché, les attachements synthéliques : les deux kinétochores sont reliés au même centrosome ou les attachements mérotéliques : le même kinétochore est lié par des microtubules provenant des deux centrosomes.

4.3.3. Aurora C - AURKC

Aurora C est la dernière des kinases Aurora découvertes. Lors d'un criblage des kinases exprimées dans le sperme et les ovules de la souris et d'un criblage des ADNc de placenta humain, deux équipes l'ont mise en évidence [74, 75]. Cette kinase n'est retrouvée que chez les mammifères et est la moins étudiée des kinases Aurora.

En temps normal, l'expression d'Aurora C est limitée aux testicules mais différentes lignées cancéreuses présentent une expression élevée, aberrante d'Aurora C [76].

Dans ces lignées, Aurora C est localisée aux centrosomes pendant la phase G2, sur

les chromosomes de la prophase à la métaphase puis au corps médian de l'anaphase à la cytotéière [77]. En mitose, Aurora C peut se lier aux composants du complexe CPC et son expression ectopique peut sauver les phénotypes liés à la déplétion d'Aurora B [78, 79]. Cependant la surexpression d'Aurora C dans les lignées cancéreuses entraîne un déplacement de la localisation centromérique d'Aurora B, augmente sa dégradation et interfère avec le SAC augmentant l'aneuploïdie [80, 81].

Aurora C est connue pour son rôle spécifique dans la spermatogénèse et l'ovogénèse. Les gamètes sont des cellules reproductrices haploïdes : elles ne possèdent qu'un seul exemplaire de chaque chromosome. Les gamètes sont générés par méiose, un processus de division cellulaire qui consiste en une seule étape de réplication de l'ADN suivie de deux divisions successives. Lors de la première division appelée méiose I, les chromosomes homologues sont séparés. Lors de la seconde division appelée méiose II, les chromatides-soeurs sont séparées comme lors de la mitose. Une erreur de séparation des chromosomes entraîne une aneuploïdie, une des causes principales de l'infertilité et des défauts de naissance chez l'humain. Comme pour la mitose, l'aneuploïdie est le résultat de différents types de défauts notamment ceux impliquant le CPC : défaut de cohésion des chromatides, d'attachements kinétochore-microtubule, de SAC et/ou de cytotéière.

Aurora C est exprimée principalement dans les cellules méiotiques et comme Aurora B, elle est une sous-unité enzymatique du complexe CPC. Cependant, la liaison avec INCENP ne se fait pas au même moment et les fonctions d'Aurora C ne semblent pas redondantes à celles d'Aurora B. Ainsi dans les ovocytes, la perte des fonctions d'Aurora C entraîne un arrêt en métaphase de la méiose I suite à une incapacité de corriger les attachements kinétochore-microtubule erronés [82]. Les souris mâles et femelles knock-out pour Aurora C sont stériles et l'absence d'une protéine fonctionnelle chez l'homme est associée à la stérilité masculine [83].

4.4. Les fonctions d'Aurora A

Les fonctions pléiotropiques d'Aurora A dépendent de ses nombreuses interactions avec divers cofacteurs et substrats qui ont lieu à différents moments, à différentes localisations et qui sont arbitrées par différents mécanismes [8, 84, 85].

4.4.1. Les fonctions mitotiques

4.4.1.1. Contrôle de l'entrée en mitose - activation de CDK1

Aurora A participe à l'entrée en mitose en supportant l'activation du complexe CDK1-cycline B *via* différents processus.

Comme mentionné plus haut, le kinase PLK1 joue un rôle majeur dans le contrôle des événements mitotiques. Elle participe au contrôle de l'entrée en mitose en induisant la dégradation de la kinase WEE1 qui maintient le complexe CDK1-CyclinB inactif et en activant la phosphatase CDC25C. Ce rôle est étroitement lié avec celui d'Aurora A car Aurora A est l'activateur principal de PLK1. L'initiation de l'activation a lieu au niveau des centrosomes *via* la formation d'un complexe avec la protéine Bora. Durant la phase G2, PLK1 est recrutée aux centrosomes par la péricentrine ce qui est nécessaire à la localisation aux centrosomes d'Aurora A. Après avoir été libérée du noyau, Bora est localisée aux centrosomes et entre en interaction directe avec PLK1. Cette interaction rend accessible la thr210 de la boucle d'activation de PLK1 pour la phosphorylation par Aurora A. PLK1 activée, phosphoryle Bora et déclenche sa dégradation. Cette rétroaction permet de maintenir le niveau de Bora sous un certain seuil et réguler la localisation et l'activation d'Aurora A. La faible quantité du complexe Aurora A-Bora restante est suffisante au maintien d'une activation adéquate de PLK1 pour assurer la séparation et maturation des centrosomes [86-89] (Figure 22).

Aurora A joue un rôle direct sur la phosphatase CDC25B. Elle phosphoryle la ser353 de CDC25B, déclenchant son activation [90].

Comme décrit plus haut, l'activité des CDC25 est nécessaire à l'activation de CDK1 [91].

La phosphorylation de CDC25B est liée à un mécanisme d'activation d'Aurora A *via* la nucléophosmine (NPM1). Cette protéine localisée au nucléole et aux centrosomes entre en interaction avec Aurora A et déclenche son autophosphorylation sur la Ser89. NPM1 s'associe avec les centrosomes non dupliqués et sa dissociation *via* sa phosphorylation par le complexe CDK2-cyclin E est nécessaire à leur duplication. L'activation d'Aurora A par NPM1 entraîne la phosphorylation de la ser353 de CDC25B et la nucléation des MTs. Aurora A et Aurora B phosphorylent également la ser125 de

NPM1 et cette phosphorylation semble essentielle pour le maintien du nombre correct de centrosomes et la cytotérière [92-94].

Avant l'entrée en mitose, CDC25 est maintenue inactive *via* la phosphorylation de son résidu ser216. La phosphatase PP1 participe à son activation en se liant et déphosphorylant cette sérine. PP1 est régulée par la protéine inhibitrice PP1R2 (inhibiteur-2) qui se lie à PP1 *via* sa partie N-terminale. PP1R2 est phosphorylée par CDK2-cyclin B et localise aux centrosomes en interphase puis sur le fuseau mitotique, le fuseau central et le corps médian en mitose. PP1R2 joue un rôle dans la séparation des centrosomes *via* la régulation de NEK2 et sa déplétion entraîne des retards dans la séparation de chromosomes et des défauts de cytotérière [95, 96]. Il a été montré que PP1R2 est capable d'activer directement Aurora A qui se lie à sa partie C-terminal. Cette liaison multiplie par 20 son activité kinase *in vitro* sans augmenter la phosphorylation de sa boucle d'activation. PP1R2 interagit *in vivo* avec Aurora A et cette interaction pourrait intervenir dans l'entrée en mitose en stimulant l'activation allostérique d'Aurora A et *via* l'inhibition de PP1 [97].

PAK1, une sérine-thréonine kinase de la famille des PAK (*P21-activated kinases*), est également impliquée dans l'activation d'Aurora A. Les PAK kinases sont des régulateurs de la cascade de signalisation liée aux propriétés de changement de forme du cytosquelette nécessaires à la mobilité des cellules. PAK1, PAK du groupe I, présente un domaine auto-inhibiteur caractéristique qui est responsable de son homodimérisation et de l'inhibition de son activité kinase. La liaison avec les petites GTPase CDC42 ou Rac délie l'homodimère et permet à PAK1 de s'activer *via* l'autophosphorylation de sa boucle d'activation. Cette phosphorylation protège également de l'inhibition *via* l'homodimérisation. En fin de phase G2, PAK1 est recrutée aux centrosomes *via* son interaction avec le complexe GIT1-PIX. GIT et PIX, présents aux centrosomes durant toutes les phases du cycle, sont des partenaires de liaison de PAK1. Ils permettent l'activation de PAK1 indépendamment des petites GTPases CDC42 ou Rac. À cette phase du cycle, l'activité kinase de PAK1 est maximale, elle phosphoryle les résidus thr288 et ser342 d'Aurora A promouvant son activation [98, 99].

PAK1 phosphoryle également Arpc1b, un composant du complexe Arp2/3. Ce complexe joue un rôle de régulateur du cytosquelette d'actine *via* l'initiation de nouveaux filaments. Arpc1b existe également sous forme de monomère et colocalise avec la γ -tubuline au niveau des centrosomes. PAK1 et Aurora A phosphorylent la thr21 de Arpc1b et cette phosphorylation est nécessaire à la formation du complexe Arp2/3. Arpc1b phosphorylé en thr21 entre en interaction directe avec Aurora A et l'active par autophosphorylation de sa boucle d'activation. La surexpression de Arpc1b

phosphorylée conduit à une amplification anormale du nombre de centrosomes tandis que sa déplétion diminue la capacité des cellules à entrer en mitose. Ce phénotype est relié à la perte d'accumulation d'Aurora A active aux centrosomes en fin de phase G2 nécessaire à l'entrée en mitose [100].

En général, il y a deux moyens de réguler les protéines kinases : le premier est de moduler leur activité kinase mais il est également possible de directement moduler leur quantité. PUM2 (*Pumilio homolog 2*) est une protéine liée aux ARNm qui réprime l'expression cytoplasmique des gènes en contrôlant leur polyadénylation et affecte leur traduction. PUM2 est localisée aux centrosomes de la phase S à la métaphase. Elle colocalise avec Aurora A qui la phosphoryle. PUM2 phosphorylée favorise la stabilité d'Aurora A en se liant à sa boîte de destruction et empêchant son ubiquitination *via* le complexe APC-CDH1. Cette interaction entre Aurora A et PUM2 favorise l'activité kinase d'Aurora A envers ses substrats et pourrait favoriser l'entrée en mitose [101].

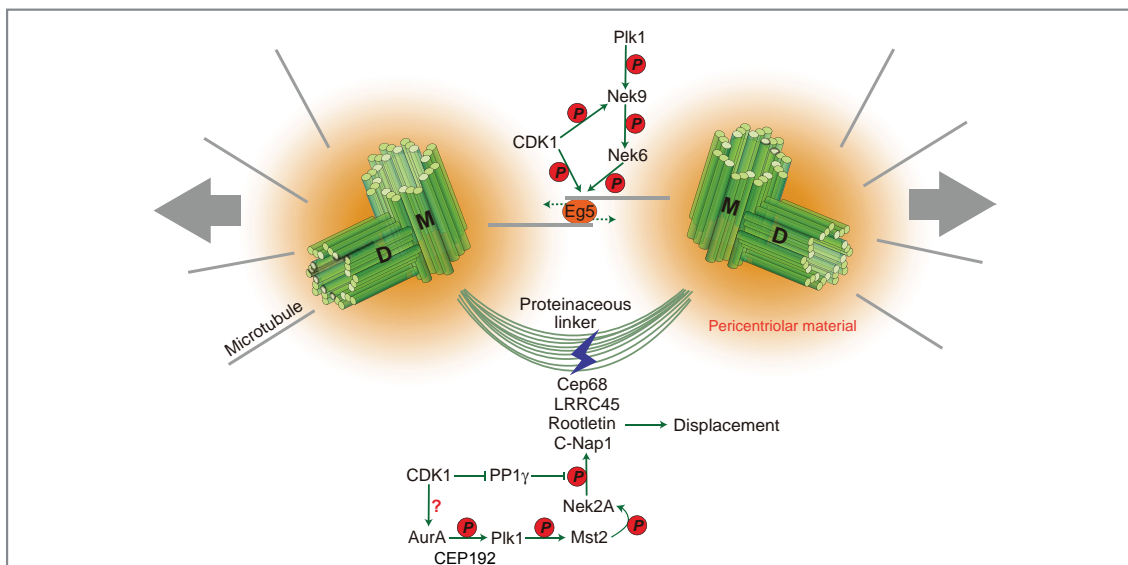


Figure 21 : Disjonction des centrosomes [8]

Représentation schématique de la régulation du processus de disjonction des centrosomes : la disjonction des centrosomes est régulée par la cascade de signalisation entre les kinases CDK1, Aurora A, PLK1 et Nek2A conduisant à la phosphorylation des protéines du lien entre les centrosomes pères C-Nap1, Rootletin, LRRC45 et CEP68. Ces phosphorylations déclenchent leur déplacement des centrosomes supprimant la jonction entre les centrosomes pères.

4.4.1.2. Maturation et disjonction des centrosomes

Comme décrit précédemment, le centrosome est le centre organisateur des microtubules dans les cellules animales. Le cycle du centrosome est étroitement lié au cycle cellulaire et le centrosome subit de nombreuses transformations (Figure 3).

En fin de phase G2, les centrosomes parentaux se délient et la taille de la matrice péracentriolaire qui entoure les centrosomes augmente drastiquement et acquiert la

capacité de nucléer et ancrer les microtubules. Ces processus de maturation et disjonction des centrosomes dépendent notamment de l'activité kinase d'Aurora A et de ses cofacteurs [65].

CEP192, une protéine échafaudage de la PCM, est impliquée dans le recrutement aux centrosomes de nombreuses protéines dont Aurora A [102].

Comme mentionné plus haut, PLK1 est recrutée aux centrosomes par la péricentrine, elle la phosphoryle et cette phosphorylation est nécessaire au recrutement de CEP192 et γ -tubuline. Aurora A et CEP192 entrent en interaction directe ce qui permet de concentrer les molécules d'Aurora A aux centrosomes qui forment des homodimères et/ou oligomères. La formation de ces oligomères amplifie et soutient l'activation d'Aurora A *via* l'autophosphorylation de sa boucle d'activation. CEP192 lie également la kinase PLK1. Aurora A et PLK1 se phosphorylent réciproquement créant une boucle d'amplification positive de leur activation. Le complexe CEP192-PLK1-Aurora A permet le recrutement de la γ -tubuline et la régulation d'un grand nombre de protéines de la PCM. Il joue un rôle dans la disjonction des centrosomes *via* l'activation de Mst2 qui phosphoryle NEK2A. NEK2A activée, phosphoryle les protéines du lien fibreux entre les centrioles parentaux, tel que C-Nap1, ce qui entraîne leur déplacement et donc la disjonction des centrosomes [103-105] (Figure 21).

Aurora A activée phosphoryle différents substrats lors de la maturation.

Aurora A phosphoryle la kinase LATS2 (*Large Tumor Suppressor 2*) sur les ser83 et ser380 jouant un rôle sur sa localisation. LATS2 est une kinase de la cascade de signalisation Hippo impliquée dans le contrôle de la taille des organes. La délétion de LATS2 entraîne la fragmentation des centrosomes et des défauts de cytotérièse. La phosphorylation de la ser83 de LATS2 par Aurora A joue un rôle sur sa localisation aux centrosomes. LATS2 se lie et phosphoryle la protéine Ajuba, un autre activateur d'Aurora A. Ces deux protéines sont nécessaires au recrutement de la γ -tubuline aux centrosomes. La phosphorylation sur la ser380 promeut la localisation de LATS2 sur le fuseau central où elle colocalise avec Aurora B et joue un rôle dans la ségrégation des chromosomes et la cytotérièse [106-109]. L'activation d'Aurora A par Ajuba, pourrait être importante pour l'activation du complexe CDK1-Cyclin B. Ce mécanisme reste débattu à l'heure actuelle [110, 111].

Aurora A phosphoryle également la protéine NDEL1 (*Nuclear Distribution element-like 1*) sur la ser251 conduisant à sa localisation aux centrosomes puis sa dégradation ubiquitine dépendante. NDEL1 avec Aurora A sont impliqués dans la localisation aux centrosomes de la protéine TACC3 nécessaire à la formation de fuseau mitotique bipolaire. L'expression d'un mutant phosphomimétique de NDEL1 compense les défauts de maturation des centrosomes liés à la suppression d'Aurora A [112].

Aurora A phosphoryle la protéine Ski impliquée dans la régulation de la transcription et la répression de l'acide rétinoïque et le facteur TGF- β (*Transforming Growth factor- β*). Localisée aux centrosomes, Ski est hyperphosphorylée en mitose et sa déplétion entraîne des défauts de ségrégation des chromosomes. Aurora A interagit *in vivo* avec la partie C-terminal de Ski et la phosphoryle sur les ser326 et ser383 ce qui réduit sa demi-vie. Une réduction du niveau de Ski entraîne l'amplification des centrosomes et la formation de fuseaux multipolaires. Ski semblerait être une cible d'Aurora A dans la cascade de signalisation responsable de la transformation en tumeur [113, 114].

Aurora A phosphoryle également les membres de la famille des centrines (CENT-2 et CENT-3). Ces protéines sont associées aux centrioles dès le début de la phase S et joueraient un rôle dans leur duplication. La phosphorylation, en prophase, de la ser170 par Aurora A joue un rôle positif sur la stabilité des centrines en contrant leur dégradation *via* le complexe APC [115].

LIMK1 (*LIM domain containing protein kinase 1*) est une sérine/thréonine kinase qui contient un domaine LIM comme la protéine Ajuba. Il a été montré qu'elle participe à différents processus cellulaires et joue notamment un rôle dans le contrôle de la dynamique des filaments d'actine et des MTs. Elle participe au positionnement du fuseau mitotique en modulant l'actine cortical *via* la phosphorylation inhibitrice des cofilines, des protéines de dépolymérisation de l'actine. La phosphorylation activatrice de sa thr508 a lieu en début de mitose et est nécessaire à sa colocalisation avec la γ -tubuline au niveau des centrosomes tandis que son inactivation est nécessaire à la complétion de la cytotéière. *In vivo*, LIMK1 est un substrat d'Aurora A qui la phosphoryle premièrement sur la ser307. Cette interaction est nécessaire à la phosphorylation activatrice de la thr508 de LIMK1 par autophosphorylation, Aurora A ou d'autres kinases. La phosphorylation de la ser307 est nécessaire au recrutement de LIMK1 aux centrosomes et à sa colocalisation avec la γ -tubuline et Aurora A. L'interaction entre Aurora A et LIMK1 induit également la phosphorylation d'Aurora A mais pas sur la thr288 de sa boucle d'activation. La déplétion de LIMK1 entraîne une diminution de 40 à 50% du niveau d'Aurora A phosphorylée en association avec des défauts de séparation des centrosomes et dans la bipolarité du fuseau [116].

Aurora A interagit directement avec la cofiline et la phosphoryle sur différents résidus dont les ser3 et ser8 et la thr25. Ces phosphorylations influencent la localisation intracellulaire de la cofiline et régule négativement son activité dépolymérisatrice des filaments d'actine. Bien qu'encore peu étudiée, l'actine a d'importantes fonctions lors de la mitose. Durant la phase G2, le cytosquelette d'actine est impliqué dans la séparation des centrosomes. L'actine corticale joue un rôle dans l'ancrage, le positionnement et l'orientation du fuseau mitotique. Enfin, la régulation de la

dynamique du cytosquelette d'actine est essentielle à la complétion de la cytotérière *via* la formation d'un anneau contractile. Aussi l'activité de la cofiline et sa régulation *via* Aurora A et LIMK1 sont nécessaires à la progression de la mitose [117].

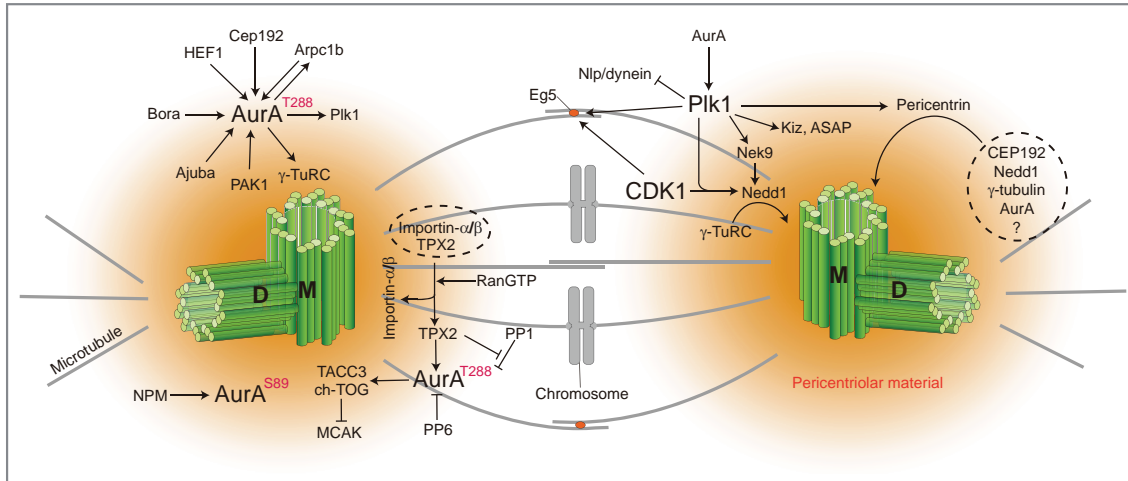


Figure 22 : Régulation de la kinase Aurora A [8]

Représentation schématique des cascades de signalisation impliquées dans la régulation d'Aurora A. Dès l'entrée en mitose, la phosphorylation de la boucle d'activation d'Aurora A est régulée par PAK1, Arpc1b, Ajuba et Bora pour soutenir l'activation de PLK1 tandis que NPM active Aurora A *via* l'autophosphorylation de sa ser89. Lors de la maturation des centrosomes, HEF1 et CEP192 participent à l'activation d'Aurora A favorisant le recrutement de la γ -tubuline. Lors de l'assemblage du fuseau mitotique, le gradient Ran-GTP autour des chromosomes permet la libération de TPX2 de son inhibition *via* le complexe importine α/β . TPX2 interagit avec Aurora A et l'active au niveau du fuseau mitotique où elle participe à l'assemblage du fuseau notamment *via* la régulation des protéines impliquées dans la nucléation et la dynamique des MTs : NEDD1, TACC3, ch-TOG et MCAK. Les phosphatases PP1 et PP6 régulent négativement l'activité d'Aurora A *via* la déphosphorylation de sa thr288.

4.4.1.3. Assemblage du fuseau mitotique bipolaire

Les fonctions du centrosomes sont finement contrôlées pour assurer la formation d'un fuseau mitotique stable et fonctionnel (Figure 22). Des fonctions anormales du centrosome conduisent à la formation de fuseaux mitotiques aberrants : plus courts, monopolaires ou multipolaires.

Aurora A joue un rôle dans la formation du fuseau *via* son activité aux centrosomes et *via* la régulation des protéines impliquées dans l'assemblage du fuseau. La déplétion d'Aurora A conduit à la formation de fuseaux multipolaires suite à la fragmentation de la PCM *via* l'altération de la dynamique des MTs. Aurora A joue un rôle sur la dynamique globale des MTs du fuseau *via* la régulation de la protéine stabilisatrice ch-TOG et la protéine déstabilisatrice MCAK. La déplétion d'Aurora A entraîne une accumulation anormale de ch-TOG aux pôles tandis que son antagoniste fonctionnel, MCAK est délocalisée des pôles. La répartition anormale de ces protéines induit la fragmentation de la PCM *via* une dynamique perturbée des MTs et le déséquilibre des

forces du fuseau [118, 119].

Chez le Xénope, Aurora A et B phosphorylent la ser196 de MCAK et inhibe son activité de dépolymérisation des MTs au niveau des pôles et de la chromatine respectivement. De plus, Aurora A régule positivement l'association de MCAK aux pôles *via* la phosphorylation de sa ser719 [120]. Dans les cellules humaines, il a été montré que MCAK interagissait avec le moteur de la famille des kinésines 8 : KIF18b pour promouvoir la dépolymérisation des MTs en mitose. La fonction de ce complexe est régulée par l'activité kinase d'Aurora A et Aurora B qui déstabilise le complexe *via* la phosphorylation de MCAK [121].

Une autre protéine de la famille des kinésines 13 joue un rôle important dans le contrôle de l'assemblage et de la dynamique du fuseau mitotique : Kif2A, la dépolymérase de MTs. Kif2A est localisée aux pôles et sur les MTs du fuseau où elle interagit avec PLK1 et Aurora A. PLK1 et Aurora A exercent une régulation antagoniste sur KIF2A. PLK1 interagit et phosphoryle KIF2A promouvant son association avec les pôles et les MTs et renforçant son activité déstabilisatrice de MTs. Inversement, bien qu'Aurora A et Kif2A colocalisent et interagissent en mitose; la phosphorylation de KIF2A par Aurora A entraîne sa dissociation des pôles et des MTs du fuseau et diminue son activité de dépolymérisation des MTs [122].

Kif2A interagit avec la MAP DDA3, qui est un autre régulateur du fuseau essentiel à la progression de la mitose. DDA3 permet le recrutement de KIF2A aux pôles et sur le fuseau et est hyperphosphorylée en mitose sur les sérines 22, 65, 70 et 223. *In vitro*, DDA3 est d'abord phosphorylée par CDK1, elle est ensuite phosphorylée par Aurora A et PLK1. Cette hyperphosphorylation permet la conversion de la forme interphasique de DDA3 capable de lier, réticuler et polymériser les MTs, en sa forme mitotique seulement capable de se lier aux MTs. La phosphorylation par CDK1 et Aurora A régule négativement les activités de polymérisation et de réticulation de DDA3 tandis que celle par PLK1 ne l'affecte pas [123, 124].

Les membres de la famille des protéines TACC (*Transforming acidic coiled-coil*) sont des protéines associées aux centrosomes et aux MTs du fuseau mitotique. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine C-terminal hautement conservé de 200 résidus : le domaine superhélice TACC (*coiled-coil domain*) qui permet l'association aux centrosomes et avec les MTs. Chez l'homme, on retrouve trois protéines de la famille TACC : TACC 1, 2 et 3. Ces protéines jouent un rôle important dans la croissance, la différenciation cellulaire et la régulation des gènes en interagissant avec des molécules impliquées dans la dynamique centrosome/MTs, la transcription et la transformation des ARNm. En mitose, elles localisent aux centrosomes et jouent un rôle dans l'organisation et la stabilisation du fuseau mitotique [125, 126].

Aurora A phosphoryle la protéine TACC3 sur la ser558 et peut-être la ser552. Cette phosphorylation est nécessaire à la localisation de TACC3 aux centrosomes en mitose. Une fois phosphorylée, TACC3 recrute les protéines CHC (*Clathrin Heavy Chain*) et ch-TOG (colonic hepatic Tumor Overexpressed Gene) au niveau des fibres kinétochoriennes. Ce complexe TACC3/ch-TOG/clathrin permet de stabiliser les fibres kinétochoriennes en formant des ponts intermoléculaires qui réticulent les MTs adjacents et forment des faisceaux stables lors de la métaphase. De plus, la protéine ch-TOG est une protéine stabilisatrice des extrémités « plus », elle polymérise les MTs et bloque l'activité de la protéine déstabilisatrice MCAK. Le recrutement du complexe TACC3/ch-TOG/Clathrin pourrait stabiliser les fibres kinétochoriennes *via* l'activité de ch-TOG [127-129]. En anaphase, l'activité d'Aurora A et la phosphorylation de TACC3 sont requises pour l'assemblage et la stabilité du fuseau central [130].

Aurora A est sumoylée en mitose et cette modification joue un rôle dans le contrôle des fonctions d'Aurora A dans l'organisation du fuseau mitotique. La sumoylation est une modification post-traductionnelle dynamique et réversible des protéines. Similaire à l'ubiquitination, la sumoylation est la liaison covalente d'une protéine SUMO (*small ubiquitin-related modifiers*) sur un résidu lysine de la protéine cible ce qui modifie son comportement. Aurora A interagit et colocalise aux centrosomes et sur le fuseau avec UBC9, l'enzyme E2 chargée de la conjugaison de la protéine SUMO. Ainsi la protéine SUMO1 est liée à la lys258 d'Aurora A et participe à sa localisation sur le fuseau mitotique. L'expression d'une forme non sumoylable d'Aurora A entraîne des défauts dans la dynamique du fuseau mitotique [131].

Aurora A joue également un rôle dans l'assemblage du fuseau au niveau de la chromatine. La présence du gradient de Ran-GTP influence son activation *via* la protéine TPX2, le premier activateur d'Aurora A mis en évidence [132]. Comme décrit plus haut, Ran-GTP permet la libération de la protéine TPX2 de sa liaison inhibitrice avec le complexe importine α/β . *In vitro*, TPX2 est capable de nucléer, lier et grouper les MTs. Une fois libérée des importines, la partie N-terminale de TPX2 lie Aurora A entraînant un changement de conformation de la kinase qui active son autophosphorylation et la protège d'une dégradation prématurée [133, 134]. Ce changement de conformation permet de protéger la thr288 de la déphosphorylation par PP1 et permet l'accès aux substrats d'Aurora A [58]. TPX2 se lie aux MTs et est nécessaire à la localisation d'Aurora A sur le fuseau mitotique mais n'a aucun effet sur sa localisation aux centrosomes [133]. L'interaction entre Aurora A et TPX2 libéré entraîne la formation d'un gradient d'Aurora A activée, parallèle au gradient de RanGTP. Cette interaction est importante pour la nucléation et l'organisation des MTs en un fuseau bipolaire à partir de la chromatine. Elle permet d'établir un fuseau

mitotique à la bonne longueur et contribue à la phosphorylation de nombreux SAFs [132]. TPX2 est elle-même phosphorylée par Aurora A indiquant un mécanisme de rétrocontrôle entre ces partenaires et une possible régulation des fonctions mitotiques de TPX2. L'activité d'Aurora A et sa liaison avec TPX2 permet de recruter un grand nombre de protéines au fuseau dont Eg5 et HURP qui participent à la morphogenèse du fuseau mitotique [58, 132, 133, 135-141].

Chez le Xénope : Aurora A, TPX2, ch-TOG, Eg5 et HURP forment un complexe nécessaire à la stabilité des fibres kinétochoriennes. Bien que ce complexe n'ait pas été mis en évidence chez l'Homme, Aurora A participe à la régulation de ce mécanisme *via* la phosphorylation des homologues de ce complexe [142].

Eg5 (KIF11) est un moteur moléculaire hautement conservé de la famille des kinésines 5. Les molécules de Eg5 forment des homotétramères avec deux domaines moteurs de chaque côté permettant de marcher sur deux MTs simultanément. Cette configuration permet à Eg5 de réticuler les MTs parallèles et antiparallèles. Eg5 participe aux mouvements des MTs antiparallèles en les faisant glisser les uns sur les autres entraînant la séparation de centrosomes et l'assemblage d'un fuseau bipolaire. Cette fonction est contrebalancée par les dynéines [143]. TPX2 interagit et cible Eg5 sur les MTs du fuseau mitotique. Cette interaction est nécessaire à la formation d'un fuseau mitotique bipolaire, stable et de bonne longueur notamment *via* la stabilisation des fibres kinétochoriennes [144, 145]. Aurora A phosphoryle Eg5 chez le Xénope mais aucune évidence d'une interaction directe entre Eg5 humaine et Aurora A n'a été encore démontrée [146]. Cependant, il a été montré que l'inhibition d'Eg5 dans les cellules humaines protège de la fragmentation des pôles lors de l'inactivation d'Aurora A [147]. De plus, une étude récente sur les inhibiteurs d'Eg5 dans le traitement du cancer montre une synergie d'action avec les inhibiteurs spécifiques d'Aurora A [148].

HURP (Hepatoma upregulated protein) est une MAP qui joue un rôle dans l'assemblage du fuseau *via* RAN-GTP. HURP est phosphorylée *in vitro* et *in vivo* par Aurora A et cette phosphorylation module les fonctions, la stabilité et les complexes formés par HURP [149]. HURP se lie aux MTs *via* son domaine N-terminal ce qui les stabilise. L'interaction de sa partie N-terminale avec les MTs dépend de son domaine C-terminal : non phosphorylé, les deux domaines interagissent ensemble inhibant la liaison aux MTs. Aurora A phosphoryle le domaine C-terminal ce qui retire l'interaction inhibitrice permettant à HURP de localiser sur les fibres kinétochoriennes et de les stabiliser. Cette phosphorylation est nécessaire à l'initiation et la stabilisation des fibres issues du gradient Ran-GTP [150, 151].

Un autre acteur dans la régulation du complexe TPX2-Aurora A a été mis en évidence : le facteur SAF-A (*scaffold-attachment factor A* = hnRNP-U). Localisé dans

le noyau en interphase, SAF-A quitte le noyau lors de la rupture nucléaire et localise sur le fuseau mitotique, le fuseau central et le pont cytoplasmique en mitose. Sa déplétion entraîne un retard mitotique, des défauts dans l'assemblage du fuseau et la déstabilisation des fibres kinétochoriennes. SAF-A entre en interaction avec TPX2 et Aurora A, le complexe TPX2-Aurora A étant nécessaire à sa liaison avec les MTs du fuseau tandis que SAF-A contribue au recrutement et maintient d'Aurora A sur ces mêmes MTs [152].

ASAP (*Aster-associated protein* ou MAP9) est une protéine associée aux centrosomes et au fuseau mitotique qui est impliquée dans l'assemblage du fuseau mitotique bipolaire, la progression de la mitose et la cytotélorèse [153]. ASAP interagit et colocalise avec Aurora A au niveau des centrosomes de l'interphase à la télophase et cette interaction stabilise ASAP, la protégeant de la dégradation *via* le protéasome. ASAP est également phosphorylée *in vivo* par Aurora A sur la ser625 et cette phosphorylation est nécessaire à la formation d'un fuseau bipolaire [154].

NEDD1 est une protéine qui interagit avec le complexe γ -TURC dont la déplétion entraîne des défauts dans le fuseau mitotique similaires à ceux obtenus lors de la déplétion de la γ -tubuline. Aurora A et NEDD1 colocalisent aux centrosomes et sur le fuseau mitotique. Aurora A interagit et phosphoryle NEDD1 sur la ser405. Cette phosphorylation n'est pas requise dans la nucléation des MTs à partir du centrosome mais est essentielle à la nucléation des MTs *via* le gradient Ran-GTP autour de la chromatine. Ainsi Aurora A joue un rôle dans la nucléation des fibres kinétochoriennes *via* la phosphorylation de NEDD1 [155].

Hice1 (HAUS8) est une MAP importante pour l'assemblage du fuseau et la ségrégation des chromosomes. De part son activité de liaison aux MTs, Hice1 est un composant critique du complexe Augmin (*Homologous to Augmin subunits - HAUS*) qui lui sert d'ancrage aux MTs. Ce complexe s'associe avec le γ -TURC pour faciliter la nucléation des MTs à partir des MTs préexistants du fuseau, promouvant ainsi la formation d'un fuseau bipolaire stable et dynamique. Aurora A interagit et phosphoryle le domaine de liaison aux MTs de Hice1 sur le groupe de sérines-thréonines 17-21 régulant négativement son activité de liaison aux MTs. Cette phosphorylation n'affecte pas la formation du complexe Augmin mais pourrait affecter sa localisation sur le fuseau. Ainsi Aurora A phosphoryle Hice1 en début de mitose permettant soit d'empêcher le chargement de Hice1 sur le fuseau soit de le détacher lorsqu'il n'est plus nécessaire; ce qui est essentiel à la séparation des pôles et la formation d'un fuseau bipolaire [156]. L'Astrin (SPAG5) est une MAP requise pour la stabilisation du fuseau, l'alignement correct des chromosomes et le maintien de la cohésion entre les chromatides-soeurs. Il a été montré qu'Aurora A et l'Astrin sont co-exprimées et colocalisent sur le fuseau

mitotique. L'interaction entre l'Astrin et Aurora A est nécessaire à la localisation d'Aurora A sur le fuseau mitotique [157]. En retour, Aurora A phosphoryle la ser115 de l'Astrin conduisant à la régulation des interactions avec ses partenaires protéiques. L'Astrin phosphorylée interagit avec les protéines SKAP (Kinastrin), CLASP-1 α et LC8 et ces interactions sont essentielles pour la progression de la mitose. Le complexe Astrin-SKAP permet l'alignement et la ségrégation des chromosomes et cible la protéine CLASP-1 α aux kinétochores. Le complexe Astrin-CLAPS-1 α promeut la stabilité des MTs kinétochoriens, l'alignement des chromosomes et l'inactivation du SAC. La localisation de LC8 aux kinétochores est régulée par l'Astrin et jouerait un rôle dans la stabilité du fuseau mitotique. L'Astrin phosphorylée interagit également avec la Sécurine conduisant à l'ubiquitination et la dégradation de cette protéine, permettant l'activation de la Séparase et donc la séparation des chromatides-soeurs. Enfin, la phosphorylation de l'Astrin par Aurora A est requise pour le maintien d'un fuseau mitotique stable et de taille normale ce qui pourrait être lié à son interaction avec CLASP-1 α [158].

4.4.1.4. Rassemblement et bi-orientation des chromosomes

Aurora A joue un rôle dans la mise en place d'un fuseau mitotique stable, de bonne longueur ce qui est nécessaire à la ségrégation des chromosomes. Aurora A joue également un rôle direct sur le rassemblement, l'alignement et la bi-orientation des chromosomes en interagissant avec les protéines centromériques CENP-E et CENP-A. CENP-A est un variant de l'histone H3 spécifique des centromères. Elle est le composant clé des centromères qui permet l'assemblage des complexes protéiques qui forment les kinétochores. En prophase, CENP-A est phosphorylée par Aurora A sur le résidu ser7 et cette phosphorylation est nécessaire à l'accumulation d'Aurora B aux centromères. Aurora B maintient ensuite la phosphorylation du résidu ser7 de CENP-A et cette phosphorylation joue un rôle dans l'attachement des MTs aux kinétochores [159].

CENP-E est un moteur moléculaire de la famille des kinésines-7 qui se déplace vers les extrémités « plus » des MTs. La fonction de CENP-E est essentielle pour le rassemblement des chromosomes localisés proche des pôles du fuseau et la liaison des MTs au kinétochores. Aurora A et B phosphorylent CENP-E sur le résidu thr422 proche du domaine moteur. La phosphorylation de ce site est essentielle aux propriétés motrices de CENP-E pour le rassemblement des chromosomes polaires tandis que sa déphosphorylation est requise pour une bi-orientation stable des kinétochores. La protéine phosphatase PP1 se lie à CENP-E sur un motif chevauchant ce site de phosphorylation lorsqu'il est déphosphorylé. Les

phosphorylations/déphosphorylations d'Aurora A et PP1 joue un rôle d'interrupteur moléculaire. Aux pôles, Aurora A phosphoryle CENP-E ce qui améliore son activité motrice et lui permet de conduire les chromosomes polaires vers la plaque métaphasique. Proche de la plaque métaphasique, PP1 déphosphoryle et se lie à CENP-E permettant l'alignement des chromosomes *via* la stabilisation et la bi-orientation de l'attachement des MTs aux kinétochores [160].

4.4.1.5. Progression mitotique

Comme décrit plus haut, la progression de la mitose requiert la dégradation des cyclines A et B *via* l'APC. Ainsi la régulation de l'activation de l'APC joue un rôle important dans le contrôle de la mitose.

RASSF1A est une protéine suppresseur de tumeur qui localise au niveau des centrosomes en interphase puis sur les pôles, le fuseau mitotique et le corps médian en mitose. RASSF1A joue un rôle dans la régulation négative de l'activité du complexe APC en liant son activateur CDC20 [161]. Elle joue également un rôle sur la dynamique des MTs en les stabilisant [162].

Ces deux activités de RASSF1A jouent un rôle dans le contrôle de la progression de la mitose en permettant l'arrêt en métaphase [162, 163].

RASSF1A et Aurora A colocalisent et interagissent en début de mitose au niveau des pôles et du fuseau. Ainsi Aurora A phosphoryle RASSF1A d'abord sur la ser203 induisant sa dissociation avec CDC20 puis sur la thr202 empêchant la liaison de RASSF1A avec les MTs. Ces phosphorylations sont nécessaire à la progression de la métaphase [162, 163].

RASSF1A jouera également un rôle dans l'activation d'Aurora A et dans la séparation des centrosomes [164].

Le complexe APC/CDC20 est actif durant la mitose et promeut le début de l'anaphase en ciblant les cyclines mitotiques et la sécurine. Il participe également à la dégradation de nombreux régulateurs mitotiques tels que PLK1, TPX2, PRC1 et son propre activateur CDC20.

Le complexe APC/CDH1 devient actif en fin de mitose et est tenu responsable de la dégradation des régulateurs mitotiques nécessaire à la sortie de mitose. Son activité continue en phase G1 pour maintenir un niveau faible de ces régulateurs. Une étude montre cependant que l'activité du complexe APC/CDH1 en fin de mitose joue un rôle spécifiquement sur la stabilité des kinases Aurora *via* leur dégradation. Cette dégradation contrôlée joue un rôle notamment sur l'organisation du fuseau central et la progression en mitose [165].

C'est l'ubiquitine ligase CHFR (*E3 ubiquitin-protein ligase CHFR*) qui est responsable de l'ubiquitination d'Aurora A. Elle cible et se lie directement à la boîte A de la partie N-terminale d'Aurora A [166]. On trouve dans cette région la ser51 qui est phosphorylée pendant la mitose. La version phosphomimétique de cette sérine bloque la dégradation d'Aurora A induite par CDH1 [61].

4.4.1.6. Assemblage du fuseau central

Bien que la fonction d'Aurora A soit essentielle en début de mitose, la localisation d'Aurora A sur le fuseau central et le corps médian suggère son implication dans les phases tardives de la mitose. Ces fonctions sont difficiles à étudier car les techniques actuelles de déplétion et d'inhibition d'Aurora A entraînent une activation du SAC suite à des problèmes de maturation et de séparation des centrosomes et/ou d'assemblage du fuseau empêchant l'analyse des phases tardives de la mitose. Le seul moyen de déterminer les fonctions d'Aurora A dans ces phases tardives est d'interférer avec son activité kinase juste après la transition métaphase-anaphase. Le développement de techniques d'inhibition et d'inhibiteurs hautement spécifiques a permis de montrer que l'activité d'Aurora A est essentielle à la progression normale des phases tardives de la mitose notamment en jouant un rôle dans l'assemblage du fuseau central [130, 166].

L'activité kinase d'Aurora A est nécessaire à la stabilisation des MTs durant l'anaphase notamment *via* son interaction avec TACC3. En anaphase, TACC3 est toujours phosphorylée par Aurora A sur la ser558 ce qui permet sa localisation sur les MTs du fuseau central et joue un rôle dans leur nucléation et leur stabilisation [130].

Comme décrit plus haut, le complexe centralspindlin est nécessaire à l'assemblage du fuseau. La relocalisation de ce complexe, du cytoplasme vers le fuseau central, dépend du complexe dynactine, le complexe activateur de la dynéine et plus particulièrement d'une de ses sous-unités, la protéine p150Glued. Dans les cellules en anaphase/télophase, Aurora A phosphoryle la ser19 de p150Glued régulant son affinité pour les MTs. L'inhibition d'Aurora A entraîne l'accumulation de p150Glued aux pôles ce qui conduit à une mauvaise localisation de la kinésine MKLP1, un composant du complexe centralspindlin provoquant de nombreux défauts dans l'assemblage du fuseau central [166].

4.4.1.7. Cytodiérèse

Comme décrit plus haut, Aurora A localise au niveau du fuseau central et une petite fraction est retrouvée au niveau du corps médian. Bien qu'il soit difficile d'étudier les fonctions d'Aurora A lors de la cytotiérèse, des indices suggèrent qu'elle participe à la

régulation de ce processus. Ainsi Aurora A phosphoryle la protéine CRMP-1 (collapsin response mediator protéine 1) sur les thr101 et thr102 et ces phosphorylations aident à la complétion de la cytotélerèse [167].

Une autre protéine de la cytotélerèse est phosphorylée par Aurora A : le facteur d'échange de la guanine GEF-H1. Comme ETC2, GEF-H1 catalyse le chargement de la GTP sur la petite GTPase RhoA. GEF-H1 localise sur les structures nécessaires à la formation et l'invagination du sillon de division. Elle localise au niveau du corps médian et est associée aux MTs liés au cortex; leur dépolymérisation conduisant à son activation. Ainsi, la perturbation de GEF-H1 entraîne des défauts de cytotélerèse suite à des défauts de coordination des événements au niveau du cortex. Aurora A phosphoryle GEF-H1, en début de mitose, sur la ser885 au niveau des pôles. Cette phosphorylation inactive GEF-H1 et une partie de cette inhibition serait le résultat de la liaison de la protéine 14-3-3 à la forme phosphorylée de GEF-H1 [168].

4.4.1.8. La fission des mitochondries

Aurora A, bien que majoritairement localisée aux pôles et sur le fuseau mitotique, présente également des fonctions au niveau des mitochondries.

Comme pour les chromosomes, il est critique lors de la division de partager les différents organites de la cellule dont les mitochondries. Les mitochondries sont nécessaires à la production d'énergie *via* la phosphorylation oxydative qui génère des molécules d'ATP et jouent également d'importants rôles dans la régulation du calcium intracellulaire, la signalisation dans les neurones, l'apoptose et l'immunité innée. Dans les cellules de mammifères, les mitochondries subissent un remodelage continu de leurs membranes *via* les cycles de fusion (la liaison de deux mitochondries pour former une nouvelle mitochondrie) et de fission (la division d'une mitochondrie en deux mitochondries). Les cellules présentent donc une population combinée de mitochondries où la balance entre la fusion et la fission contrôle la structure des mitochondries. Cette balance est dépendante du type cellulaire et relative aux fonctions mitochondriales et cellulaires. Une augmentation de la fusion et une réduction de la fission entraînent la formation d'un réseau allongé de mitochondries tandis que la diminution de la fusion et l'augmentation de la fission causent la fragmentation mitochondriale [169].

Chez les mammifères, les cellules en interphase présentent un long réseau tubulaire mitochondrial qui se fragmente lors de la mitose. La fission mitochondriale nécessite le recrutement de DRP1 (Dynamain-related protein 1 - DNM1L) sur la membrane externe des mitochondries ainsi que la phosphorylation de sa ser616 par le complexe CDK1-

cycline B. Sa concentration et phosphorylation sont favorisées par RALBP1 un effecteur de la petite GTPase RalA. RalA est phosphorylée par Aurora A sur la ser194 ce qui entraîne sa relocalisation de la membrane plasmique à la membrane externe des mitochondries. Sur les mitochondries, RalA phosphorylée recrute et active RALBP1. Ainsi la phosphorylation par Aurora A de RalA est nécessaire à la fission des mitochondries lors de la mitose [170-172].

La fission des mitochondries est un processus essentiel lors du déroulement de la mitose et la déplétion des protéines clés dans ce processus entraîne des défauts sévères de la progression de la phase G2/M [173].

4.4.1.9. Régulation de l'épissage alternatif d'ARNm apoptotiques

Chez l'Homme, les précurseurs d'ARN messagers (pré-ARNm) subissent de l'épissage alternatif (AS - *alternative splicing*). Ce processus présente une importante variabilité entre les tissus et au cours du développement créant une vaste source de diversité et de régulation biologique. Ainsi, ce processus est très souvent dérégulé dans le cancer et d'autres maladies.

Le contrôle de l'épissage est intégré à la régulation de la transcription promouvant une régulation dynamique en fonction du contexte biologique. Un des concepts émergents dans la régulation des ARNm, est qu'une population de transcrit présentant une cohérence fonctionnelle est co-régulée par des protéines liées aux ARN (RBPs) pour promouvoir une fonction biologique spécifique. Ces RBP, notamment les protéines SR et hnRNPs lisent les éléments *cis* et *trans* du transcrit et contrôlent l'assemblage du splicéosome. En effet, le splicéosome est un assemblage de cinq particules ribonucléoprotéiques (snRNP) qui contrôle l'excision des introns et la suture des exons. Lors de la phase M, ces fonctions sont généralement réduites. Cependant, il a été montré que l'induction de l'arrêt en mitose promeut l'AS pro-apoptique des facteurs Bcl-x et Mcl1 et modifie l'épissage de plusieurs transcrits apoptotiques. Le criblage de régulateurs de l'épissage des ARNm de ces facteurs apoptotiques a conduit à l'identification d'Aurora A et d'autres protéines du cycle cellulaire comme étant des régulateurs de leur AS.

Les facteurs Bcl-x et Mcl1 appartiennent à la famille des protéines Bcl-2 et possèdent des domaines d'homologie. Sous leur forme longue, comprenant quatre domaines d'homologies, ces facteurs antagonisent l'apoptose en préservant l'intégrité de la membrane externe des mitochondries. Sous leur forme courte, présentant moins de quatre domaines d'homologies, ces facteurs deviennent pro-apoptiques et favorisent la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries. L'intégrité des

mitochondries et par conséquent la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases sont finement contrôlée par la balance entre les facteurs pro et anti-apoptotiques. C'est l'AS qui conditionne la production des formes longues anti-apoptotiques et courtes pro-apoptotiques de Bcl-x, Mcl1 et d'autres facteurs de la famille Bcl-2 et l'inhibition d'Aurora A entraîne un fort décalage de l'AS de leur ARN vers la forme courte. Ces résultats ont été confirmés dans différentes lignées cellulaires. Ce décalage a lieu avant l'arrêt des cellules en mitose *via* une régulation directe de l'AS des ARNm de Bcl-x et Mcl1, déclenchée par l'activation de point de contrôle de la mitose.

L'analyse du réseau d'interaction des protéines impliquées dans la régulation de l'AS de ces facteurs apoptiques montre qu'Aurora A est au coeur de ces interactions. Sa déplétion entraîne une régulation à la baisse du facteur d'épissage ASF/SF2 (SFRS1), une protéine SR liée à la régulation du cycle cellulaire. Ce facteur se lie directement aux ARNm de Bcl-x, Mcl1 et joue un rôle dans l'épissage de leur forme anti-apoptotique. Ainsi la déplétion d'Aurora A et de ASF/SF2 favorise l'épissage pro-apoptique des ARNm de Bcl-x, Mcl1 et de la capsase 9 qui s'accumulent dans les cellules en mitose précédant leur arrêt et promouvant leur mort par apoptose [174].

4.4.2. Les fonctions non mitotiques d'Aurora A

Bien qu'une grande quantité d'Aurora A soit dégradée en sortie de mitose, une sous-population reste dans les cellules en interphase. Majoritairement localisée aux centrosomes, on la retrouve également dans le cytoplasme et le noyau. [175]

4.4.2.1. Désassemblage du cil primaire

Dans les cellules en G0, le centrosome sert de corps basal au cil primaire. La relation entre le cil, le cycle du centrosome et le cycle cellulaire est très étroite et Aurora A y joue un rôle notamment au niveau du corps basal.

Aurora A interagit avec HEF1, une protéine échafaudage aussi appelée NEDD9. En interphase, cette protéine localise au niveau des points d'adhésions focaux et agit en tant qu'intermédiaire dans différents processus de signalisation dépendants des intégrines (récepteur d'adhésion cellulaire) comme dans l'attachement, la migration et la survie de cellules. Comme d'autres protéines des points d'adhésion focaux, HEF1 relocalise en mitose aux niveaux des centrosomes et du fuseau mitotique. En mitose, l'interaction entre Aurora A et HEF1 induit l'activation d'Aurora A [176]. En interphase, HEF1 et Aurora A colocalisent au niveau du corps basal et la résorption du cil est précédée par l'activation d'Aurora A. Ainsi, les facteurs de croissance induisent

l'expression de HEF1 qui active Aurora A au niveau du corps basal. Aurora A activée phosphoryle et active la protéine déacétylase HDAC6. Les microtubules qui constituent l'axonème du cil sont acétylés : les sous-unités de tubulines sont modifiées *via* la liaison d'un groupement acétyle. Cette modification post-traductionnelle permet de stabiliser la structure de l'axonème. HDAC6 activée, catalyse le déacétylation des tubulines, ce qui déstabilise l'axonème et promeut son désassemblage [66, 177].

Un mécanisme d'activation d'Aurora A en réponse à la signalisation calcique a été récemment mis en évidence. La libération d'ion calcium (Ca^{2+}) entraîne la liaison de la calmodulin à Aurora A et son activation *via* l'autophosphorylation de ses résidus ser51, ser53/S54 et ser66/S67. Ce moyen d'activation d'Aurora A est hautement transitoire et la désactivation apparaît dans les 3 minutes qui suivent l'activation. Cette activation en réponse à une augmentation rapide et transitoire du calcium cytosolique permet à Aurora A de phosphoryler des substrats à différents moments du cycle. Ainsi des pics transitoires de Ca^{2+} ont été observés au niveau des centrosomes en mitose et la perturbation de la liaison d'Aurora A avec le complexe Ca^{2+} /Calmodulin inhibe la progression en mitose. En interphase, cette activation est nécessaire au désassemblage du cil et promeut l'interaction entre Aurora A et NEDD9 [178, 179].

Un second facteur appelé PIFO, localisé au corps basal, est requis pour l'activation d'Aurora A lors du désassemblage du cil mais le mécanisme n'est pas encore connu [180].

4.4.2.2. Autres fonctions interphasiques

Les fonctions d'Aurora A et du centrosome sont étroitement liées même lors de l'interphase. L'inhibition chimique d'Aurora A dans les cellules en interphase perturbe significativement la dynamique du réseau microtubulaire interphasique [181]. Aurora A est également abondamment exprimée dans les neurones post-mitotiques et joue un rôle dans l'élongation des neurites *via* la réorganisation des microtubules [182, 183].

Aurora A joue également un rôle dans la migration cellulaire, sa surexpression induisant une forte augmentation de la migration cellulaire tandis que son inhibition la réduit significativement. Lors de ce processus, les kinases Aurora A et FAK sont phosphorylées et activées par la protéine Src. Aurora A est également activée *via* son interaction avec l'acide phosphatidique produit par la phospholipase D. En retour, Aurora A phosphoryle FAK et la phospholipase D2. *Via* Aurora A, cette cascade de signalisation entraîne la rapide polymérisation et la stabilisation de la tubuline [67].

4.5. Les activités carcinogènes d'Aurora A

Comme discuté dans le chapitre dérégulation et cancer, des aberrations dans les cascades de signalisation régulant la croissance cellulaire, la mort cellulaire et la différenciation conduisent à la transformation des cellules et la carcinogénèse. Les kinases de la famille Aurora font partie des protéines jouant un rôle dans ce processus. Différentes études ont montré que les trois kinases humaines sont en surabondance dans les cellules cancéreuses et leur inactivation ou surexpression conduisent à l'apparition de cellules aneuploïdes [76, 184-186].

La surabondance d'Aurora A s'explique *via* différents mécanismes. La région dans laquelle on retrouve le gène codant Aurora A est un locus fréquemment amplifié dans les tumeurs créant une amplification génétique d'Aurora A [187, 188]. La transcription d'Aurora A peut également être altérée dans les cellules cancéreuses conduisant à une surexpression de la protéine [184]. La surabondance peut également provenir d'une stabilité anormale de la protéine Aurora A *via* la surexpression de partenaires protéiques qui la stabilisent ou au contraire la sous-régulation des partenaires responsables de son inhibition et de sa dégradation. Ainsi HEF1 et TPX2 sont fréquemment amplifiées dans les tumeurs favorisant la stabilité d'Aurora A tandis que CHFR, l'ubiquitine ligase responsable de la dégradation d'Aurora A est fréquemment sous-exprimée [176, 189, 190].

Les phénotypes liés à une surexpression d'Aurora A sont la présence de fuseaux multipolaires, l'aneuploïdie, une résistance à l'apoptose et des points de contrôles du cycle cellulaire déficients [184, 186, 191]. La surexpression d'une Aurora A sans activité kinase peut également entraîner une amplification des centrosomes, ce qui montre que la seule présence d'Aurora A est aussi importante que son activité kinase [192]. Ce sont principalement des défauts de cytodierèse des cellules surexprimant Aurora A qui sont à l'origine des phénotypes d'amplification des centrosomes [192].

Ainsi, les mécanismes pouvant être à l'origine des phénotypes liés à la surexpression d'Aurora A sont multiples (Figure 23). Dans un premier temps, l'altération des fonctions normales d'Aurora A est la conséquence d'interactions constitutives dérégulées et déphasées du cycle cellulaire. Ces interactions non contrôlées entraînent des défauts en cours de mitose et conduisent à l'aneuploïdie et l'instabilité génétique. Aurora A surexprimée peut également former de nouvelles interactions et phosphoryler de nouveaux substrats en dehors de la mitose dans d'autres compartiments cellulaires. En effet, la surexpression d'Aurora A perturbe sa localisation : elle est ainsi détectée dans les compartiments cytoplasmiques et le noyau tout au long du cycle cellulaire [85].

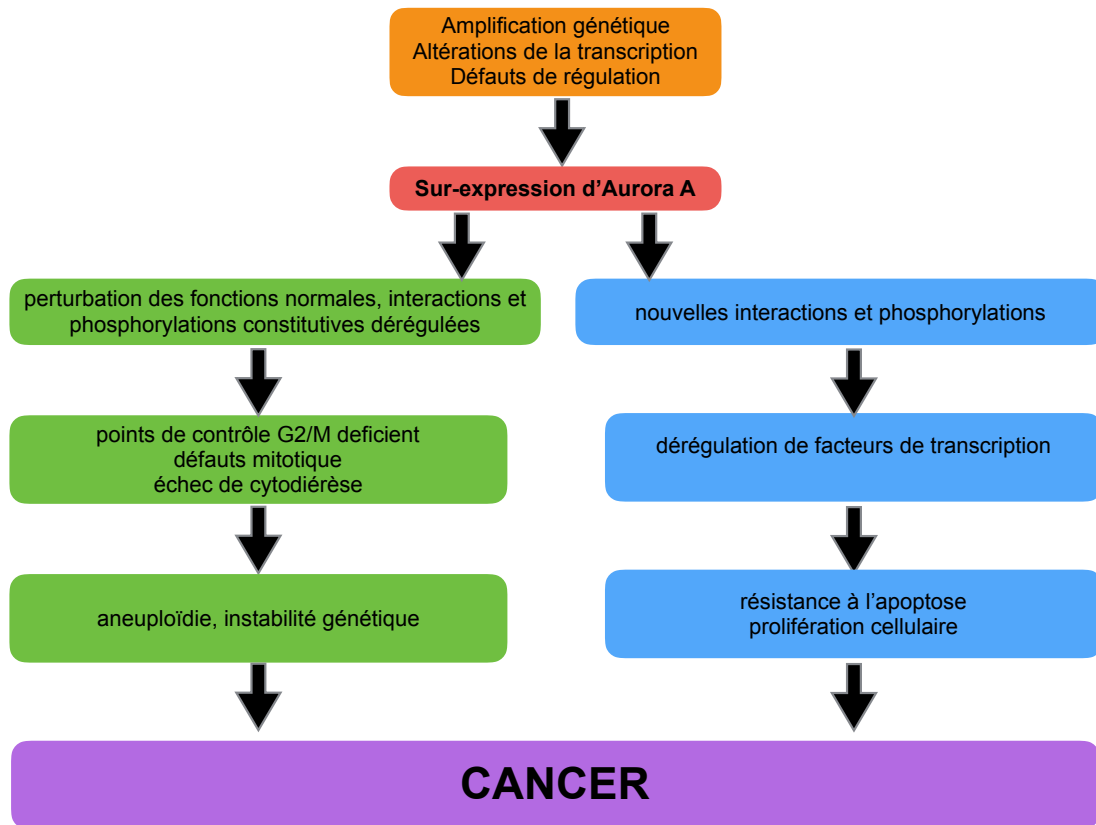


Figure 23 : Activités carcinogènes d'Aurora A (d'après [85])

Représentation schématique des étapes conduisant à la carcinogenèse *via* la dérégulation d'Aurora A. On retrouve dans les tumeurs une amplification génétique, une altération de la transcription et/ou des défauts de régulation d'Aurora A qui conduisent à sa sur-expression. La sur-abondance d'Aurora A entraîne une altération de ses fonctions normales *via* la dérégulation de ses interactions et phosphorylations constitutives notamment en mitose. On peut observer une déficience des points de contrôle G2/M, des défauts mitotiques et l'échec de la cytodièrese ce qui conduit à l'aneuploïdie et l'instabilité génétique des mécanismes clés dans le développement d'un cancer. Aurora A sur-exprimée est également localisée dans le noyau et le cytoplasme tout au long du cycle formant de nouvelles interactions et phosphorylant de nouveaux substrats. Aurora A dérégule des facteurs de transcription impliqués dans l'activité des points du cycle et l'apoptose comme p53 et p73.

4.5.1. Interactions constitutives dérégulées : exemple de RALA

Comme décrit plus, en mitose, Aurora A phosphoryle RalA sur le ser194 entraînant sa relocalisation de la membrane aux mitochondries ce qui est nécessaire à leur fission. Dans les cellules tumorales, RalA est activée *via* la cascade de signalisation Ras ce qui favorise la croissance et la migration des cellules tumorales [193]. La délocalisation de RalA de la membrane plasmique aux compartiments intracellulaires *via* sa phosphorylation par Aurora A est un processus clé de cette fonction [194]. Ainsi, la surexpression d'Aurora A en combinaison avec la dérégulation de Ras favorise la carcinogenèse *via* la dérégulation des fonctions de RalA [193, 194].

4.5.2. Nouveaux substrats : exemple de LIMK2

LIMK2 est une sérine-thréonine kinase de la famille des kinases LIM. Comme LIMK1, un substrat mitotique d'Aurora A, LIMK2 phosphoryle la cofilin et inhibe son activité de dépolymérisation de l'actine [195]. LIMK2 n'est pas une kinase mitotique et sa surexpression dans certains cancers du sein et de la prostate est corrélée avec celle d'Aurora A. En effet, Aurora A et LIMK2 sont impliquées dans un boucle de rétroaction positive. Aurora A phosphoryle LIMK2 sur les ser293, thr494 et thr505 favorisant sa localisation cytoplasmique, sa stabilité et son activité kinase. En retour, LIMK2 se lie à Aurora A *via* son domaine LIM et cette interaction la stabilise. Bien que LIMK2 ne la phosphoryle pas directement, son activité kinase joue un rôle dans la stabilisation d'Aurora A. Enfin, la déplétion de LIMK2 inhibe complètement la carcinogénèse induite par Aurora A. Aussi, LIMK2 est un effecteur oncogénique clé d'Aurora A [196].

4.5.3. Dérégulation de facteurs de transcription

La surexpression d'Aurora A et sa présence au niveau du noyau et du cytoplasme entraînent une perturbation de nombreux mécanismes de régulation de la cellule dont celui *via* les facteurs de transcription [197-200].

4.5.3.1. Les facteurs de transcription p53

Le facteur de transcription p53 joue un rôle majeur dans les mécanismes d'arrêt de la prolifération et de détermination du futur de la cellule. La perte de p53 dans les cellules cancéreuses entraîne une instabilité génétique et une amplification des centrosomes [201, 202]. Ainsi, il a été montré qu'une surabondance d'Aurora A est corrélée avec une perte de p53 dans les cellules cancéreuses [203, 204]. En effet, Aurora A et p53 sont impliquées dans une boucle de régulation négative finement régulée. Aurora A phosphoryle la ser315 de p53 favorisant sa dégradation *via* la cascade de signalisation MDM2 [197]. Elle phosphoryle également la ser215 de p53 ce qui inhibe ses liaisons à l'ADN et l'activation en aval de ses différentes cibles comme p21^{waf1/cip1}, PTEN [205]. Cependant, une troisième phosphorylation de p53 par Aurora A a été identifiée par spectrométrie de masse : la ser106. Contrairement à la phosphorylation de la ser315, cette phosphorylation inhibe l'interaction entre p53 et MDM2, réduisant l'ubiquitination de p53 et augmentant sa stabilité [206].

Les perturbations de l'activité de p53 *via* Aurora A favorise l'activation de la kinase AKT impliquée dans l'inhibition de l'apoptose et la résistance à la chimiothérapie [207]. Ainsi, Aurora A régule la survie tumorale *via* la phosphorylation activatrice de la ser473 d'AKT [207].

Enfin, la surexpression d'Aurora A induit également l'inactivation de p73, une protéine membre de la famille p53, en phosphorylant sa ser235. Cette inactivation contribue à la perte du point de contrôle de la transition anaphase-métaphase en perturbant le complexe CDC20-MAD2 ce qui induit une résistance à l'apoptose [200].

En retour, il a été montré, dans des tumeurs mammaires de souris, que la surexpression d'Aurora A n'induisait la carcinogénèse que dans des cellules qui n'exprimaient pas p53 [208]. p53 interagit avec la boîte A d'Aurora A et inhibe son activité kinase limitant sa capacité à transformer les cellules en tumeur [209]. p53 participe également à l'expression de Gadd45 α . Cette protéine nucléaire est exprimée lors de dommages à l'ADN et interagit avec Aurora A. Cette interaction inhibe de manière spécifique l'activité kinase d'Aurora A et empêche l'amplification des centrosomes [210, 211].

L'étude des interactions entre les cascades de signalisation d'Aurora A et de p53 doit être approfondie. En effet, la plupart des études rapporte que l'excès d'Aurora A abolit l'arrêt du cycle aux transitions G1/S et G2/M, en réponse aux dommages à l'ADN *via* notamment la perte de p53 et l'inactivation de p73 [204]. Cependant, la mise en évidence d'une phosphorylation stabilisatrice de p53 par Aurora A complique le modèle dans lequel Aurora A *via* p53 conduirait à une augmentation de l'aneuploïdie, de l'instabilité génétique et à une résistance à l'apoptose [206].

4.5.3.2. Les facteurs de transcription Myc

Une autre famille de facteurs de transcription présente une dérégulation corrélée avec la surexpression d'Aurora A : les facteurs de transcription Myc [212-214]. Ces facteurs de transcription jouent un rôle dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, la transformation des cellules et sont fréquemment mutés dans les tumeurs, devenant continuellement actifs [215].

La surexpression d'Aurora A perturbe la dégradation de N-Myc *via* la cascade de signalisation du complexe GSK3-Fbxw7 [214]. Ce processus est indépendant de son activité kinase et serait dû à la promotion de la synthèse de chaînes de poly-ubiquitine ne déclenchant pas la dégradation [214]. La cascade de signalisation GSK3-Fbxw7 induit également la dégradation d'Aurora A [216]. Cependant le rôle de la kinase GSK3 n'est pas encore bien défini : elle phosphoryle les ser90 et 91 d'Aurora A ce qui régule négativement son activité kinase et phosphoryle également AURKAIP1 (*Aurora A kinase interacting protein 1*) inhibant sa capacité à promouvoir la dégradation d'Aurora A *via* la protéine Az1 (*antizyme 1*) [217, 218]. En retour, il a été montré qu'Aurora A interagit directement avec GSK3 et l'inactive en phosphorylant sa ser9 [219]. Cette

inactivation entraîne l'accumulation nucléaire de la β -caténine, un facteur de transcription qui régule l'expression de C-Myc [219]. Ainsi, la surexpression d'Aurora A régule positivement l'expression de C-Myc et induit une augmentation de l'activité de la télomérase *via* l'augmentation de la transcription de hTERT [220]. Enfin une étude récente a montré que C-Myc participait à la surexpression d'Aurora A notamment en induisant sa transcription [215].

4.5.3.3. Autres facteurs de transcription

La surexpression d'Aurora A dérégule d'autres facteurs de transcription comme notamment AP-2 α et NF- κ B *via* I κ B α [198, 199, 221].

AP-2 α est un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire dont l'expression est couramment réduite dans les tumeurs ce qui le classe parmi les suppresseurs de tumeur. Aurora A interagit physiquement avec AP-2 α et favorise sa dégradation par le protéasome. Cette régulation étant dépendante de l'activité kinase d'Aurora A, elle devrait impliquer des événements de phosphorylation [199].

NF- κ B est un facteur de transcription présentant un large spectre d'action dans la promotion de la croissance et la survie tumorale. L'activation de NF- κ B dépend de la protéine I κ B α qui la séquestre dans le cytoplasme en se liant et masquant son signal de localisation nucléaire. Aurora A phosphoryle I κ B α sur les ser32 et ser36 induisant sa dégradation et par conséquent permettant la translocation nucléaire de NF- κ B [198, 221].

Ces facteurs de transcription sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire et la surexpression d'Aurora A favorise, à travers leur dérégulation, la croissance tumorale.

4.6. Les inhibiteurs d'Aurora A dans le traitement du cancer

Sur la base de la descriptions de ses différentes fonctions au cours du cycle cellulaire et dans le processus de carcinogenèse, Aurora A est devenue une cible d'intérêt dans le développement de médicaments anti-cancéreux. Ainsi, 48 essais cliniques utilisant des inhibiteurs spécifiques d'Aurora A sont actuellement répertoriés sur clinicaltrials.gov, le site de l'institut national de la santé des Etats-Unis. En 2012, l'Alisertib (le MLN8237), un inhibiteur spécifique d'Aurora A développé par la compagnie Millenium, est entrée en phase III de test clinique dans le traitement des rechutes des lymphomes T périphériques. Ce test s'est arrêté en mai 2015 car il ne montrait pas d'effet significatif sur le critère de survie sans progression [communiqué

de presse, 13 mai 2005, compagnie pharmaceutique Takeda]. Les différents mécanismes d'activation et de stabilisation d'Aurora A notamment liés à la multiplicité de ces partenaires protéiques compliquent le développement d'inhibiteurs et l'interprétation des résultats observés. Aussi la visualisation de ces partenaires et des cascades de signalisation dans lesquelles elle est impliquée pourrait aider au développement de nouveaux traitements.

5. L'analyse des réseaux d'interactions protéiques

Avec le séquençage du génome de différentes espèces, on possède maintenant un inventaire des protéines potentiellement exprimées au sein de ces organismes. Cette liste de protéine n'est pas suffisante pour décrire les processus biologiques, il faut maintenant analyser comment leurs actions sont coordonnées. En effet, à travers la revue des processus mitotiques, en général, et des fonctions de la kinases Aurora A en particulier, on comprend que ces processus sont orchestrés et régulés par un réseau d'interactions dynamiques entre les protéines qui relaie les stimuli physiques et chimiques au sein de la cellule. Ainsi l'analyse des complexes protéiques et des réseaux d'interactions protéine-protéine est essentielle dans la compréhension des processus biologiques et des conséquences de leur perturbation lors de l'utilisation d'inhibiteur de kinase par exemple. Ainsi la construction et l'analyse de ces réseaux appelés interactomes est aujourd'hui une discipline à part entière appelée interactomique.

Il existe différentes approches pour analyser ces réseaux et une des plus communément utilisée est la combinaison de la purification par affinité à l'analyse par spectrométrie de masse (AP-MS).

5.1. Principe de l'AP-MS

5.1.1. Identification des protéines par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (MS) est un puissant outil analytique qui permet l'identification rapide et fiable des protéines issues d'un échantillon biologique. Il mesure le rapport masse sur charge (m/z) des peptides ionisés permettant ensuite de déterminer avec les logiciels adaptés leur masse moléculaire. La mesure se fait en deux étapes, c'est la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Dans une premier temps, on mesure le rapport m/z du peptide intact, appelé peptide parent, c'est le spectre MS. Il est ensuite isolé, fragmenté et le rapport m/z des fragments est mesuré, c'est le spectre MS/MS. La fragmentation au niveau des liaisons peptidiques des

peptides parents permet de déterminer leur séquence en AA et de reconstituer la composition en protéines de l'échantillon. Pour l'identification d'une protéine à partir d'une liste de peptides, il faut généralement deux peptides issus de cette protéine voir eplus si plusieurs protéines partagent une même liste de peptides. L'autre avantage de la détection par MS est la possibilité d'identifier des modifications post-traductionnelles des protéines de l'échantillon (Figure 24 - A) [222, 223].

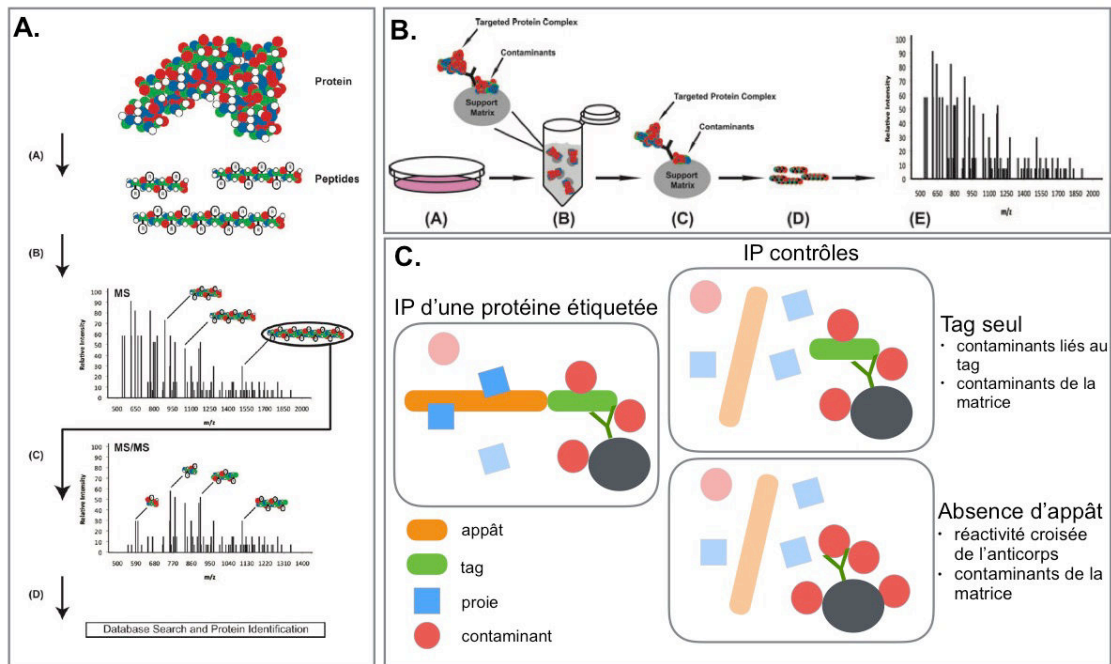


Figure 24 : Les principes de l'AP-MS [222]

A - Représentation schématique des étapes de l'analyse protéomique : (A) la protéine est digérée par une protéase, couramment la trypsine. (B) Le rapport m/z des peptides est ensuite mesuré à partir du spectre MS. (C) Un peptide sélectionné est ensuite fragmenté et le rapport m/z des fragments est mesuré c'est le spectre MS/MS. (D) Les rapports m/z des fragments et du peptide sont ensuite comparés à ceux d'une banque de données et permettent d'identifier la protéine dont ils sont issus. **B** - Représentation schématique des étapes de la purification par affinité : (A) Les cellules exprimant la protéine d'intérêt sont cultivées et récoltées. (B) La protéine d'intérêt et ses partenaires sont purifiés par affinité envers la protéine ou un tag qui lui est fusionné grâce à un ligand couplé à un support solide. (C) La protéine d'intérêt et ses partenaires sont ensuite isolés des protéines non spécifiques grâce à des étapes de lavage successives. (D) Les protéines et ses partenaires sont ensuite élués et digérés par une protéase. (E) Les peptides obtenus sont séparés par chromatographie liquide et identifiés par MS/MS. **C** - Schéma des IP contrôles permettant d'identifier les contaminants avec l'utilisation d'une protéine étiquetée.

5.1.2. L'immunoprécipitation (IP)

La purification par affinité est une technique qui permet de capturer du matériel biologique *via* l'enrichissement spécifique d'un ligand couplé à un support solide (Figure 24 - B). Différentes catégories de ligands existent et les anticorps sont très utilisés pour l'isolement des protéines. Ainsi, une purification d'affinité utilisant des anticorps s'appelle une immunoprécipitation. L'inconvénient inhérent à la purification par affinité est la présence de faux positifs qui proviennent principalement d'interactions non spécifiques avec le ligand, le support solide et des contaminations externes. L'identification de ces faux positifs nécessite l'utilisation d'expériences contrôles difficiles à mettre en place dans les études d'AP-MS. De plus, la réalisation d'IP de réplicats biologiques est un point clé dans l'identification des contaminants [223].

L'utilisation d'anticorps permet de cibler de manière spécifique une grande variété de protéines. Les anticorps peuvent cibler directement la protéine d'intérêt appelée appât ou un *tag* auquel elle est fusionnée.

5.1.2.1. Immunoprécipitation directe

Le ciblage direct de l'appât permet de purifier la protéine dans sa forme native. Les inconvénients de la reconnaissance directe d'épitopes de la protéine par l'anticorps sont la possibilité de perturber les interactions protéine-protéine générant des faux négatifs et la possibilité d'être inefficace en présence de modifications post-traductionnelles de la protéine. De plus, tous les anticorps ne présentent pas la même affinité et spécificité pour un épitope donné et les conditions de purification directe de l'appât nécessitent des étapes d'optimisation. Enfin les expériences de contrôles optimaux sont difficiles à réaliser. L'utilisation d'un anticorps non spécifique (dirigé contre une protéine sans rapport à l'expérience) ne permet pas d'obtenir une représentation précise des interactions non spécifiques liées à la réactivité-croisée des anticorps. Ainsi la réalisation d'une immunoprécipitation de l'appât dans un échantillon biologique où il est déplété serait le plus optimal, mais ce n'est pas toujours possible et cela peut entraîner un changement global du protéome qui n'est plus représentatif de l'expérience test.

5.1.2.2. Immunoprécipitation de protéines étiquetées

Comme alternative il est possible d'utiliser un anticorps dirigé contre une étiquette (ou *tag*) fusionnée à la protéine d'intérêt, ce qui offre différents avantages :

- Différentes protéines peuvent être étiquetées et purifiées de la même manière

ainsi la liste de contaminants devrait être constante d'une expérience à l'autre.

- La purification du *tag* exprimé seul dans les échantillons constitue une bonne expérience contrôle.
- Il existe une plus grande variété d'anticorps commerciaux dirigés contre les *tags* couramment utilisés, ils sont soumis à un contrôle qualité et présentent généralement une forte spécificité.
- L'utilisation d'un *tag* fluorescent permet de contrôler l'expression et la localisation de la protéine d'intérêt étiquetée au sein de l'échantillon biologique.

Ces étapes de vérification sont nécessaires car les inconvénients majeurs de cette alternative sont les potentiels effets préjudiciables liés à la présence du *tag* sur la protéine et son expression exogène. La surexpression et/ou la présence du *tag* peut entraîner un mauvais repliement, une délocalisation et/ou une dérégulation de la protéine perturbant ses interactions protéine-protéine et augmentant les faux positifs et faux négatifs.

5.1.3. Elimination des contaminants

Quelle que soit la technique utilisée, des contaminants sont toujours présents et il est difficile de les différencier des vrais partenaires protéiques. Augmenter la stringence en utilisant des étapes de lavage, diminuant les temps de purification ou les volumes de matrice permet de réduire le nombre de contaminants mais peut entraîner la perte d'interactions faibles ou transitoires. De plus, la seule présence d'une protéine dans les expériences contrôles n'est pas suffisante pour discriminer son statut de contaminant ou de vraie interaction. L'analyse de l'enrichissement quantitatif au travers des expériences, constitue un meilleur moyen de statuer de la probabilité de l'interaction [223]. Différentes approches utilisant des traceurs isotopiques ou sans marquage ont été développées pour obtenir cette quantification.

5.1.3.1. L'approche SILAC

L'utilisation d'isotopes lourds incorporés aux protéines permet de tracer leur signal au spectromètre de masse grâce à leur différence de masse avec les isotopes naturels dits légers. Cette propriété a permis de mettre en place différentes approches de protéomique quantitative comme la méthode SILAC (*Stable Isotope Labeling with Amino acids in cell Culture*) [224]. Cette approche consiste à cultiver les cellules pendant plusieurs générations en présence d'acides aminés marqués isotopiquement, dits lourds, pour remplacer les AA naturels correspondants. Les protéines marquées par ces AA lourds sont mélangées en proportions égales à celles d'une expérience

contrôle et ce mélange est analysé par MS. L'abondance relative des protéines est déterminée grâce à la mesure des différences d'intensité entre les pics lourds et légers correspondants. Cette technique peut être utilisée pour discriminer les contaminants des vraies interactions et analyser les différences d'abondance en réponse à divers facteurs [225]. Elle permet également de quantifier des événements de phosphorylation et d'identifier de nouveaux sites de phosphorylation [226].

5.1.3.2. Méthode sans marquage

Pour rapidement discriminer les contaminants des méthodes informatiques ont également été développées. Elles utilisent des paramètres directement accessibles comme le compte spectral, indiquant le nombre de fois où un peptide a été détecté par le spectromètre de masse, l'intensité des spectres MS et MS/MS ou les scores attribués par les moteurs d'identification. L'idée est de distinguer le signal correspondant à une vraie interaction dans l'expérience test, du signal de cette même interaction dans l'expérience contrôle qui correspond au bruit. A partir de ces valeurs quantitatives, des approches informatiques permettent de donner un score aux interactions détectées ou de fixer un seuil entre l'enrichissement et le bruit.

5.2. Analyse des interactomes

Une fois la liste des partenaires établie, la représentation de leurs interactions sous forme de réseau fournit un cadre permettant de visualiser les processus cellulaires. La cellule est représentée sous la forme d'un système complexe dans lequel chaque élément est susceptible d'influencer les autres. Cependant, la complexité de ces réseaux limite l'interprétation et certains paramètres clés doivent être pris en compte dans la construction de ces réseaux [227].

Un des premiers points à prendre en compte est l'identification des protéines. En effet, depuis leur découverte leur nom évolue au fil du temps. Bien qu'une protéine corresponde à une séquence en AA, elle peut également avoir différentes isoformes. Ainsi, il existe diverses bases de données dans lesquelles les stratégies d'identification sont différentes. Par exemple, les bases de données UniProtKB propose deux stratégies de compilation différentes [228]. La base de données UniProtKB/TrEMBL est annotée automatiquement, elle contient un haut niveau de redondance car chaque séquence contenant une différence en AA est identifiée. Dans la base de données UniProtKB/Swiss-Prot générée manuellement, chaque gène est identifié, de manière non redondante, avec un seul identifiant sous lequel on retrouve tous les isoformes de la même protéine.

Les bases de données des interactions sont également différentes dans la gestion des interactions répertoriées. Les informations détaillant l'interaction peuvent être plus ou moins détaillées, organisées manuellement ou automatiquement et de sources différentes : de la littérature, des bases de données et/ou de la prospection automatique de données (*datamining*). Ces paramètres doivent être pris en compte lors de l'analyse et la représentation des PPI (interaction protéine-protéine) [229].

Les données d'interactions sont communément représentées sous forme de graphes ou de réseaux. Les partenaires d'interaction sont visualisés sous forme de noeud et les interactions sont des lignes ou flèches reliant les noeuds. Différentes stratégies de visualisation peuvent ensuite être appliquées pour clarifier le réseau comme des codes couleur, la variation de la taille des noeuds, etc. De nombreux outils permettant la représentation des interactomes existent. Un des plus populaire est Cytoscape, un logiciel gratuit, open-source qui contient de nombreuses applications destinées à l'analyse des réseaux d'interactions protéine-protéine (PPIN) [230].

Une fois l'interactome représenté, son analyse consiste à comprendre comment les protéines agissent ensemble pour remplir des processus biologiques. Pour cela, la stratégie de base consiste à analyser les relations et les similitudes entre les diverses informations attribuées aux noeuds comme par exemple leur localisation cellulaire, leur schéma d'expression, leurs fonctions cellulaires, leurs domaines protéiques ou l'implication dans une maladie. Les noeuds peuvent également être regroupés en fonction de leur distribution au sein de l'interactome et leur degré de connexion en faisant l'hypothèse que des protéines massivement interconnectées interviennent dans des processus biologiques similaires. Il existe une variété importante d'algorithmes permettant d'analyser ces données de topologie provenant notamment de l'analyse de réseaux sociaux. Ces approches non biaisées permettent de mettre en évidence de nouveaux réseaux fonctionnels entre des protéines qui n'ont a priori rien à voir entre elles [231].

Aussi pour permettre une analyse plus approfondie de l'interactome, les noeuds et les interactions peuvent être annotées avec une grande diversité d'attributs en fonction de l'analyse souhaitée. L'annotation peut être réalisée manuellement à partir des données de l'expérimentateur ou automatiquement à partir des bases de données. La source d'annotations la plus utilisée dans l'analyse des PPIN est le consortium Gene Ontology (GO) [232]. Le GO fournit une description des protéines uniformisée à partir de données expérimentales et analytiques. Ces descriptions sont tirées d'un registre de vocabulaire contrôlé et hiérarchisé appelé ontologies. Les ontologies sont divisées en trois grands registres indépendant : compartiment cellulaire, processus biologique et fonction moléculaire. Sont regroupés dans compartiment cellulaire, les termes

décrivant un composant d'une cellule qui fait partie d'un objet plus grand comme une structure cellulaire (noyau ou mitochondrie par exemple) ou un complexe protéique (protéasome ou ribosome par exemple). Les termes de processus biologiques décrivent une série d'événements accomplie par l'assemblage de fonctions moléculaires comme par exemple le cycle cellulaire ou le transport du glucose. Les fonctions moléculaires réfèrent aux activités enzymatiques ou moléculaires de la protéine comme la phosphorylation ou l'activité de liaison par exemple. Au sein de ces trois catégories, les ontologies sont hiérarchisées allant du plus général au plus spécifique. D'autres bases de données basées sur un principe similaire d'uniformisation existent, elles permettent d'annoter les protéines notamment en fonction des cascades de signalisation ou des maladies comme Reactome [233] et KEGG [234]. A partir de ces annotations de nombreux outils d'analyse ont été développés permettant de mettre en évidence un enrichissement ou une sous représentation de certains attributs [235].

Objectifs de la thèse :

La kinase Aurora A est une protéine multi-fonctionnelle principalement impliquée dans la régulation de la mitose. De récentes publications montrent cependant qu'Aurora A présente des fonctions en dehors de la régulation des centrosomes et du fuseau mitotique. De plus, les phénotypes décrits dans l'étude des mutants des différents organismes modèle, décrits lors de la déplétion par des ARN interférents ou décrits lors de l'inhibition de l'activité kinase ne sont pas encore tous compris. Ces difficultés de compréhension sont liées aux multiples partenaires protéiques d'Aurora A qui guident ses fonctions en participant à sa régulation, sa localisation et son activation. En retour, ils sont eux même régulés par Aurora A créant un réseau complexe de mécanismes de régulation. Pour permettre une meilleure compréhension des fonctions d'Aurora A, l'étude à grande échelle de ses partenaires est une stratégie intéressante. En ce sens, deux études ont été publiées en 2010 et 2011. Une approche *in silico* développée par Sardon et al. a permis de générer une liste de 90 substrats mitotiques potentiels [236]. Kettenbach et al. ont combiné la phosphoprotéomique quantitative à l'utilisation d'inhibiteurs chimiques pour identifier des substrats mitotiques des kinases Aurora A, Aurora B et PLK1 dans une lignée cellulaire humaine [237]. Ils ont identifié 778 sites de phosphorylation sur 562 protéines parmi lesquelles 101 ont été classées par des analyses bioinformatiques comme étant des substrats d'Aurora A. Cependant ces deux études sont centrées sur l'identification des substrats mitotiques d'Aurora A reliés pour la plupart à des fonctions déjà connues. L'analyse des partenaires directs d'Aurora A offre des perspectives d'identification de complexes plus diversifiés. Il a notamment été montré qu'Aurora A présentait des fonctions indépendamment de son activité kinase [192].

Ainsi, les travaux réalisés au cours de ma thèse ont consisté à modéliser et analyser un interactome de la kinase Aurora A. J'ai développé une lignée cellulaire (Partie 1 des résultats) permettant la mise en place d'expériences contrôles pour l'utilisation de la méthode d'AP-MS. J'ai utilisé cette méthode pour isoler et identifier de nouveaux partenaires d'Aurora A puis mis en application différents outils bioinformatiques pour discriminer les contaminants, évaluer les interactions, construire, visualiser et analyser l'interactome (Partie 2). Enfin pour valider mes travaux, j'ai choisi d'étudier *in vivo* les partenaires potentiels WDR62 (Partie 3) et CEP97 (Partie 4). Aussi, ces travaux ont permis de mettre en évidence de nouveaux partenaires d'Aurora A impliqués dans la mitose et dans de nouvelles fonctions : liées au cil primaire, aux mitochondries et à

l'épissage des ARNm qui sont actuellement étudiées dans le cadre de nouveaux projets développés au sein de l'institut.

Matériel et Méthodes

1. Protéines recombinantes

La protéine recombinante Aurora A étiquetée avec un *tag* histidine et la queue N-terminale de l'histone H3 étiquetée avec un *tag* GST (*Glutathione S-transferase*) ont été purifiées par Jean-Yves CREMET. Clonées dans des vecteurs d'expression pET29 et pGEX respectivement, des bactéries *Escherichia coli* sont transformées avec ces plasmides puis l'expression des protéines est induite avec 1mM d'IPTG pendant 4h. Les bactéries sont ensuite centrifugées et conservées à -80°C. Pour la purification, le culot de bactéries est soniqué dans du tampon de lyse (140mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, pH 7,3, 0,1% de Triton X-100 et 1mg/ml de lysozyme), chargé sur des billes Talon (Takara Bio Inc.) et lavé. Les protéines sont ensuite éluées avec un tampon contenant 50mM d'imidazole. La partie C-terminal de WDR62 recombinante de 630AA et la forme pleine longueur de CEP97 étiquetées avec le *tag* GST ont été achetées chez *Novus Biologicals*. Les protéines recombinantes sont conservées à -80°C exceptée Aurora A qui est conservée dans 50% de glycérol à -20°C pour préserver son activité kinase.

2. Transfection

La déplétion de WDR62, Aurora A et CEP97 est obtenue par transfection pendant 24, 48 ou 72h des oligonucléotides siARN avec le réactif de transfection JetPrime (Polypus Technologies) en accord avec les instructions de fabricant. Les siARN utilisés sont :

siAurA : 5'-AUGCCCUGUCUUACUGUCA-3'

siWDR62 #1 : 5'-AGAAUCAGGUGGCGGAGAU-3'

siWDR62 #2 : 5'-CCAACAUGACAUGGTGCUCAA-3'

siCEP97 #1 : 5'-GAUGAGAAGUGAAAUCAAU-3'

siCEP97 #2 : 5'-UGAGAAAGCUGGACUAUUA-3'

La déplétion stable d'Aurora A dans les lignées GFP-AurA shRNA est obtenue par transfection d'un shARN (*small hairpin RNA*) avec le JetPrime en accord avec les instructions du fabricant. Les lignées clonales sont obtenues *via* la sélection et l'isolation des cellules résistantes à 2ug/ml de puromycine. La séquence du shAURA (clone NM_003600.x-985s1c1, SIGMA) utilisée est:

5'-

CCGGCCTGTCTTACTGTCATTTCGAACTCGAGTTTGAATGACAGTAAGACAGGTTTT
T-3'

Les formes sauvage et as (*analogue sensible*) d'Aurora A (GFP-AURA et GFP-as-AURA) ont été insérées dans le vecteur pEGFP-C1 dont le promoteur CMV a été remplacé par la région minimale nécessaire à la régulation de la transcription d'Aurora A pour conduire à une expression physiologique de GFP-AURA et GFP-as-AURA [166]. Des mutations silencieuses ont été introduites entre les positions 729 et 741, la région ciblée par le siAURA pour empêcher la déplétion des formes GFP-AURA et GFP-as-AURA. Ainsi, la séquence 5'-CCTGTCTTACTGT-3' est remplacée par la séquence 5'-ACTATCATATTGC-3'.

Les lignées clonales sont obtenues *via* la sélection et l'isolement des cellules résistantes à 1,25mg/ml de G418. La mutation de la leucine 210 en alanine d'Aurora A pour obtenir la forme as-AURA est générée par le kit de mutagenèse rapide (*Quickchange, Agilent Technologies*) [166].

3. Culture cellulaire, synchronisation et inhibition

Les cellules humaines U2OS sont cultivées dans du milieu McCoy's + Glutamax complémenté avec 10% de Sérum de Veau Foetal et la pénicilline/streptomycine 1X (Invitrogen). Les cellules humaines HeLa sont cultivées dans du milieu DMEM + Glutamax complémenté avec 10% de Sérum de Veau Foetal et de la pénicilline/streptomycine 1X (Invitrogen). Les cellules sont synchronisées en mitose après l'ajout dans le milieu pendant 18h de 1µg/ml de taxol (Selleckchem). Les cellules bloquées en métaphase par un traitement au taxol ne présentent que 1% de changements dans l'ensemble de leurs phosphorylations [237].

La répartition des cellules dans le cycle cellulaire est déterminée par cytométrie en flux. Les cellules sont récoltées par trypsinisation (Invitrogen), centrifugées, lavées, fixées dans de l'éthanol à -20°C et marquées au propidium iodide (0,1% de citrate de sodium, 0,3% Nonidet P40, propidium iodide 50mg/ml et ARNase A 20mg/mn). Elles sont ensuite analysées par cytométrie en flux sur la plateforme du CRCHU de Québec.

L'inhibition complète de l'activité kinase de la GFP-as-AurA est obtenue par un traitement sur 24h avec 10 µM de 1-Na-PP1 (*1-Naphthyl-PP1* - Selleckchem) [166].

L'inhibition d'Aurora A sauvage est obtenue par un traitement avec 50nM de MLN8237 (Selleckchem) sur 24h. Le MLN8237 (Alisertib, Takeda Pharmaceutical Company) est un inhibiteur de seconde génération actuellement utilisé dans différentes phases de tests cliniques. Cet inhibiteur présente une sélectivité 200 fois supérieure pour Aurora A par rapport à Aurora B et un panel de 205 kinases [238].

4. Western-Blot

Les extraits totaux de cellules et les résultats d'immunoprecipitation sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium) et transférés sur une membrane PVDF poreuse (taille des pores 0,2 μ m). Les membranes sont incubées à température ambiante pendant 1h avec une solution de blocage : tampon TBS 1X (*Tris-Buffered Saline*) contenant 5% de lait en poudre non gras et 0,1% de Tween20 puis sondées sur la nuit avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage. Après lavage des anticorps primaires, les membranes sont incubées pendant 1h à température ambiante avec les anticorps secondaires couplés à l'HRP (*horseradish peroxidase*), dilués dans la solution de blocage. La liaison des anticorps est détectée par chemiluminescence (Pico ou Dura, Thermo Fisher Scientific).

5. Immunofluorescence

Les cellules sont préalablement cultivées sur une lamelle de verre. Les cellules sont ensuite lavées au tampon phosphate salin (PBS, *phosphate buffered saline*), fixées avec du méthanol à -20°C pendant 10min et lavées trois fois au PBS froid. Les lamelles sont incubées pendant 1h à température ambiante dans un tampon de saturation : PBS 1X, 0,1% de Tween 20 et 1% de BSA (albumine sérique bovine). Les anticorps primaires sont dilués dans le tampon de saturation et incubés sur la nuit : anti-AurA souris (clone 35C11, 1:20, [239]), anti-AurA lapin (1:250, Sigma), anti- α -tubuline rat (1:1000, Millipore), anti-centrin souris (1:500, Millipore), anti-tubuline acétylée souris (1:10000, Sigma), anti-WDR62 et anti-CEP97 lapin (1:250, Bertyl Laboratories). Après incubation, les lamelles sont lavées et incubées pendant 1h dans le noir avec les anticorps secondaires dilués dans du tampon de saturation : anti-souris, anti-rat et anti-lapin Alexa Fluor 488 ou 546 ou 647 (1:1000, Invitrogen). Après trois derniers lavage au PBS, les lamelles sont montées sur des lames de verres dans du milieu de montage Prolong gold (Invitrogen) avec 1 μ g/ml de Hoechst (Invitrogen). Les cellules sont examinées au microscope à épifluorescence inversé (IX71, Olympus) équipé d'un éclairage à LED (InsightSSI 7 Coulor Combined Unit) à l'objectif huile 60x 1,42NA (Olympus) bénéficiant du système Delta Vision Elite (Applied Précision). Trente images sont acquises sur le plan z à 0,30 μ m d'intervalles et l'analyse d'image est réalisée avec Fiji [240, 241].

6. Imagerie de cellules vivantes

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Pétri à fond en verre (Matek corporation) et placées dans une chambre thermostatée à 37°C avec une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Pendant 2h, toutes les 2 minutes, trente images d'une cellule en division sont acquises sur le plan z à 0,30 µm d'intervalles avec le microscope à épifluorescence décrit ci-dessus.

7. Essai kinase *in vitro*

La quantité indiquée de protéines recombinantes est mélangée dans un tampon kinase : 50nM de Tris HCl pH à 7,5; 25 mM NaCl, 1mM DTT, 0,01% Triton X-100 et 10 mM MgCl₂. Ensuite 100µM d'ATP non radioactif ou 2µCi d'ATP[γ-³²P] sont ajoutés au mélange réactif qui est incubé pendant 10min à 37°C. La réaction est stoppée par l'ajout de tampon dénaturant et portée à ébullition pendant 5min. Les échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et l'autoradiographie des membranes est réalisée avec un Storm 840 (Molecular Dynamics).

8. Immunoprécipitation d'Aurora A-GFP

Les cellules U2OS contrôles, U2OS transfectées avec le plasmide pEGFP-C1 et GFP-AURA shARN sont cultivées dans 6 boîtes de Pétri de 150mm jusqu'à une confluence de 80% (entre 12 et 15 millions de cellules par pétri) puis synchronisées en mitose par un traitement au taxol (90% de cellules en mitose). Les cellules sont ensuite lavées 2 fois au PBS froid puis récoltées dans du tampon de lyse : 50mM de HEPES pH 7,5; 120mM NaCl, 0,3% CHAPS, 1mM EDTA, 1 tablette/50ml d'anti-protéase (Roche). Les cellules des 6 pétries sont resuspendues dans 20ml de tampon de lyse et lysées pendant 20min à 4°C avec agitation douce. Le matériel insoluble est retiré après centrifugation.

L'IP est réalisée avec 200µl de billes recouvertes de manière covalente avec des protéines G (*Dynabeads, Invitrogen*). Elles sont lavées deux fois avec du tampon Na-acétate 0,1mM pH 5 puis couplées avec 10µg d'anticorps de souris anti-GFP (Roche). Les billes couplées aux anticorps sont ensuite incubées pendant 1h avec 1ml de PBS contenant 1% massique de la BSA pour bloquer les sites de liaisons non-spécifiques puis lavées trois fois au tampon de lyse. Elles sont ajoutées au lysat cellulaire et

incubées pendant 2h à 4°C avec une agitation douce. Les échantillons sont ensuite lavés 4 fois avec du tampon de lyse pendant 15min avec agitation douce et les complexes sont élués avec du tampon Laemmli contenant 5% de β -mercaptoéthanol. Les échantillons sont chauffés à 65°C pendant 5min, déposés sur gel et coloré au Sypro Ruby (Bio-Rad) en suivant le protocole du fabricant.

9. Analyse par spectrométrie de masse

Les protéines dans le gel sont ensuite visualisées par illumination UV. Tout le profil est découpé en une dizaine de bandes qui sont transférées dans une plaque 96 puits pour être lavées à l'eau. La digestion tryptique des protéines contenues dans ces bandes est réalisée avec un station robotique de manipulation des liquides (MassPrep, Waters) selon les instructions du fabricant en suivant le protocole de Shevchenko et al. avec les modifications suggérées par Havlis et al [242, 243]. Brièvement, les protéines sont réduites avec 10mM de DTT et alkylées avec 55mM de iodoacétamide. Pour la digestion enzymatique, 126nM de trypsine modifiée (*Sequencing grade*, Promega) sont ajoutés et incubés à 37°C pendant une nuit. Les peptides obtenus sont extraits avec une solution à 1% d'acide formique dans 2% acétonitrile puis une solution d'1% d'acide formique dans 50% acétonitrile. Les extraits de peptides sont rassemblés, séchés au SpeedVac et repris dans 7ul d'une solution à 2% d'acétonitrile avec 0,05% d'acide trifluoroacétique. 5ul de cette solution de peptides sont analysés en spectrométrie de masse. Le spectromètre de masse utilisé est un nanoLC/MS/MS Triple-TOF 5600 plus (AB Sciex). Cet appareil se compose d'une chromatographie liquide de haute performance (Agilent 1200) couplée à une source d'ionisation electrospray (NanoSpray III; AB Sciex), un quadripôle, une cellule de collision et un analyseur à temps de vol (TOF). Les échantillons sont injectés par l'échantillonneur automatique (Agilent 1200) dans une colonne de 15 cm de longueur et 0,075mm de diamètre interne (*self-packed* PicoFrit, New Objective) La phase stationnaire se compose de billes C18 de 5 μ m (Jupiter C18, Phenomenex, gel de silice greffé par des groupements octadécyles) en suspension dans de l'isopropanol et déposées sous une pression de 700psi. Les échantillons sont séparés sur la colonne pendant 65min à un débit de 300nl/min avec un gradient de 5 à 35% d'un solvant à 0,1% d'acide formique dans l'acétonitrile contre un solvant à 0,1% d'acide formique dans de l'eau. Les données sont acquises avec une tension de 2,4kV, un rideau de gaz inerte à 30psi, un gaz de nébulisation à 8psi et une température de 125°C. On utilise le mode d'acquisition automatique dépendant de l'information (IDA) qui permet l'acquisition, pendant 250ms, des spectres MS dans la gamme 400-1250 amu suivis de l'analyse,

pendant 50ms, des spectres MS/MS générés compris dans la gamme 100-800 amu. L'analyse couvre les 20 ions les plus intenses, avec des charges de 2+ à 5+ en mode haute sensibilité. L'exclusion dynamique permettant d'obtenir des spectres MS/MS sur les ions de plus faible intensité est réglée à 3s avec une tolérance de 100ppm.

10. Analyse des données protéomiques

Les données générées par le LC/MS/MS 5600 triple-TOF sont traitées avec le logiciel ProteinPilot version 4.5 (AB SCIEX), lequel génère une liste d'ions à partir des spectres MS et MS/MS. Cette liste renseigne les rapports m/z des peptides analysés et des fragments issus de ses peptides en utilisant les algorithmes Paragon et Progroup [244]. Cette liste est ensuite analysée avec le moteur de recherche Mascot version 2.4.1 (Matrix Science) avec la base de donnée UniProtKB/Swiss-Prot (version 20140903, 43122 entrées) et X! Tandem version CYCLONE 2010.12.01.1 (The GPM, thegpm.org) avec un sous-ensemble de la même base de donnée. Les recherches sont réalisées avec une tolérance de 0,100Da (monoisotopique) pour les peptides parents et leur fragments. Les paramètres de recherches utilisés sont les suivants : une modification fixe pour la carbamidométhylation des cystéines et des modifications variables pour l'acétylation des amines terminales, l'oxydation des méthionines, la phosphorylation des sérines, thréonines et tyrosines. L'enzyme de digestion sélectionnée est la trypsine stricte avec maximum trois clivages manquants.

L'identification des peptides et des protéines est validée avec le logiciel d'analyses statistiques des données de spectrométrie de masse Scaffold version 4.4.6 (Proteome Software). L'identification des peptides est acceptée si elle est établie à plus de 95% de probabilité par l'algorithme « Local FDR » de Scaffold [245]. L'identification des protéines est acceptée si elle peut être établie à plus de 99% de probabilité et présente au moins deux peptides identifiés. La probabilité d'identification des protéines est assignée par l'algorithme Protein Prophet [246].

11. Analyses bioinformatiques

Pour discriminer les partenaires des contaminants j'ai utilisé la méthode d'évaluation sans marquage SAINT (*Significance analysis of Interactome*) [247]. Cette méthode repose sur un algorithme d'espérance-maximisation (EM) qui permet d'estimer les paramètres d'un modèle statistique dans lequel les variables latentes sont non observables. Ainsi le but de la méthode SAINT est de convertir le nombre de spectre d'une proie i dans une expérience avec l'appât j en une probabilité d'être une vraie interaction entre les deux protéines P_{ij} . Pour cela, le nombre de spectres du couple

proie-appât est modélisé en un mélange de deux distributions de Poisson représentant les vraies et les fausses interactions. Ces distributions sont spécifiques pour chaque couple proie-appât. Les paramètres des deux distributions et le calcul de la probabilité d'une vraie interaction entre un couple appât-proie ij sont tirés des nombres de spectres observés pour ce couple dans chaque expérience réalisée. Ainsi, le nombre de spectres est normalisé par rapport à la longueur de la protéine et le nombre total de spectres de l'expérience pour être le reflet d'une valeur quantitative. De plus, SAINT modélise la distribution des fausses interactions à partir des données des IP contrôles ce qui affine le modèle. A partir de ces modélisations, on détermine une probabilité d'être une vraie et une fausse interaction. Ce résultat est utilisé pour redéfinir le modèle qui donne une nouvelle probabilité qui redéfinit le modèle et ce de manière itérative. Ainsi après un nombre d'itérations suffisant, défini par l'utilisateur, on tend vers une valeur de probabilité d'être une vraie interaction la plus vraisemblable possible.

J'ai utilisé le module SAINT mis en ligne sur crapome.org avec les paramètres suivant : n-burn = 2000 les 2000 premières itérations ne sont pas utilisées pour éviter un biais; n-iter = 10000, 10000 itérations sont faites, LowMode = 0, cette option n'est pas utilisée car avec un seul appât, la force d'interaction d'une proie devrait être la même pour chaque expérience, MinFold = 1, la valeur moyenne de la distribution des vraies interactions doit être au minimum 10 fois supérieure à celle des fausses interactions, Normalize = 1, le nombre de spectres des proies est normalisé par rapport au nombre de spectres total de chaque expérience car les expériences contrôles présentent moins de spectre [247].

Le nombre de spectres pour chaque proie est le compte spectral total tirés des résultats obtenus dans Scaffold avec les paramètres spécifiés plus haut. C'est la somme des spectres assignés à une proie avec une probabilité d'attribution égale ou supérieure à 95%. Les IPGFP dans les cellules U2OS et U2OS-GFP sont utilisés comme IP contrôles.

Pour visualiser le PPIN que forment les partenaires potentiels d'Aurora A, nous utilisons le logiciel open source Cytoscape (version 3.0.2) [230, 248]. J'ai généré les tables nécessaires à la construction de l'interaction à partir des données obtenues avec SAINT. Le type d'interaction entre Aurora A et ses partenaires potentiels est défini comme des interactions protéine-protéine non-directionnelles, la taille et la couleur des noeuds sont modifiées en fonction des différents paramètres la table : la catégorie d'interaction, la classification des partenaires et l'AvgP pour chaque proie. A partir des 180 protéines classées dans la catégorie des fortes Pv, j'ai utilisé l'application Bisogenet pour générer le réseau d'interaction entre ces partenaires [249].

Cette application permet de récupérer et de combiner les données d'interaction des bases BIND, BIOGRID, DIP, MINT, INTACT et HPRD à partir des identifiants protéiques fournis. Toutes les données d'interaction répertoriées entre les 180 protéines des cinq bases de données ont été utilisées. À partir de ce réseau, la fonction de sélection des premiers voisins de cytoscape a permis de générer un sous-réseau des partenaires d'Aurora A, ces partenaires présentent une ou plusieurs interactions avec Aurora A répertoriées dans les bases de données. J'ai utilisé l'application MCODE avec les options par défaut pour isoler des regroupements d'interactions entre protéines [250]. Enfin, pour l'annotation et l'analyse de l'enrichissement des GO, j'ai utilisé l'application ClueGO [251]. Cette application permet de visualiser les termes biologiques non redondants attribués à un regroupement de protéines. Pour faire l'analyse, j'ai utilisé la base de données GeneOntology, Processus Biologiques et Compartiment cellulaire, définie pour Homo Sapiens (version 23.10.2015, <http://geneontology.org/>) téléchargée *via* l'application. A partir de la liste de protéines fournies à ClueGO, l'application sélectionne les termes en fonction des critères de filtrage donnés par l'utilisateur. Ainsi, il est possible de choisir le degré de détails des termes associés, la gamme va d'un réseau global utilisant des GO de niveau 1 à trois, à un réseau détaillé utilisant les GO spécifique de niveaux 9 à 14. Le réseau global est caractérisé par un haut niveau de gènes associés dans chaque terme mais un faible pourcentage de gènes d'intérêts trouvés et l'inverse pour le réseau détaillé. ClueGO calcule la signification statistique de chaque terme et fusionne sous le terme le plus statistiquement significatif, les termes relatifs qui partagent les mêmes gènes associés. Les options statistiques utilisées pour chaque analyse sont un calcul de l'enrichissement avec un test hypergéométrique, une correction de la p-value avec la méthode Holm-Bonferroni (*Bonferroni step-down*) et comme ensemble de référence, les Ontologies de la base de données. L'option de fusion de GO est utilisée ainsi que le regroupement sous le terme étant le plus statistiquement significatif. Ainsi, pour le calcul de l'enrichissement des compartiments cellulaires, un réseau global utilisant les GO de niveau 2 à 6 est généré sans modification des options avancées. Pour le calcul de l'enrichissement des processus biologiques, un réseau détaillé, utilisant les GO de niveau 8 à 15, est généré sans modifications des options avancées.

Résultats

1. Construction du modèle cellulaire

1.1. Caractérisation de l'expression de GFP-AurA dans la lignée GFP-AurA-shRNA

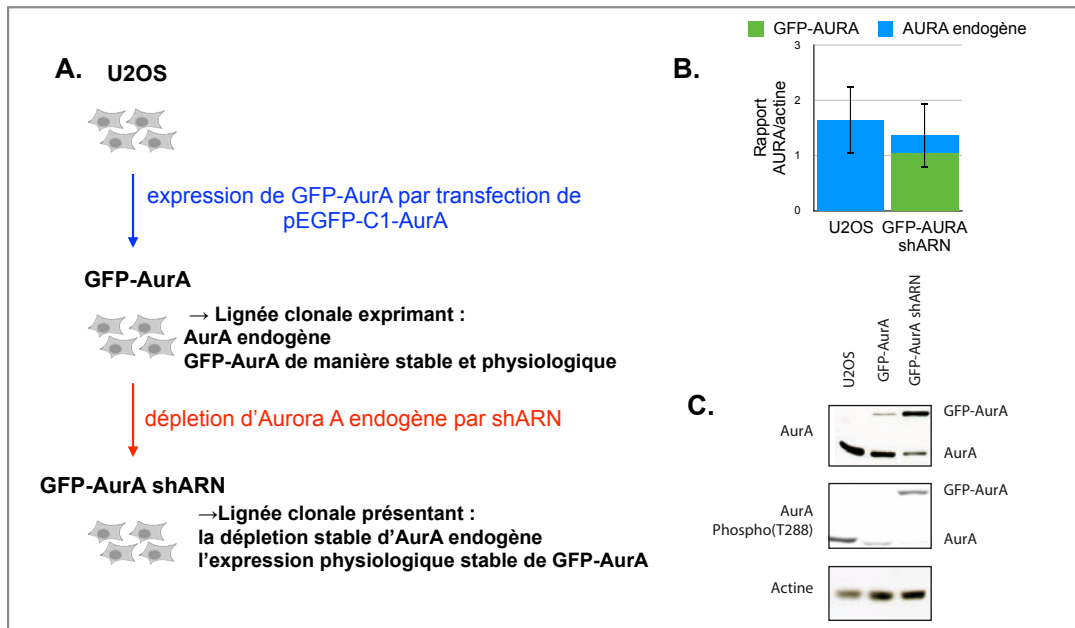


Figure 25 : Caractérisation de l'expression de GFP-AURA dans la lignée clonale GFP-AURA shARN

A - Schéma des étapes de préparation de la lignée clonale GFP-AURA shRNA : A partir de la lignée U2OS exprimant la GFP-AURA de manière stable à un niveau endogène, la dépletion continue de la kinase endogène est obtenue avec l'utilisation d'un shARN. B - Quantification relative du niveau totale d'expression d'Aurora A endogène et étiquetée dans trois expériences de synchronisation en mitose : le niveau totale Aurora A endogène et GFP-Aurora A est similaire au niveau d'Aurora A endogène dans la lignée U2OS contrôle. C - Western-blot montrant le niveau d'expression d'Aurora A et Aurora A phosphorylée sur la thr288 dans les lignées U2OS, GFP-AURA et GFP-AURA shARN : le niveau d'expression de la GFP-AURA ainsi que la phosphorylation sur sa thr288 augmente avec la dépletion de l'endogène et atteint un niveau comparable à celui de l'endogène dans la lignée contrôle.

Dans un premier temps, j'ai construit une lignée cellulaire dans laquelle Aurora A endogène est déplétée de manière stable au cours du temps et qui exprime, en remplacement, une version étiquetée d'Aurora A fonctionnelle, exprimée à des niveaux physiologiques.

Ainsi, le remplacement d'Aurora A endogène par une Aurora A couplée à un *tag* GFP s'est fait en deux étapes (Figure 25 - A). Dans un premier temps, les cellules ont été transformées pour exprimer de manière stable et à des niveaux physiologiques la GFP-Aurora A [166]. Ainsi, l'utilisation comme promoteur de la région minimale

nécessaire à la régulation de la transcription d'Aurora A permet une expression stable de GFP-AurA inférieure à celle d'Aurora A endogène. La déplétion par siARN d'Aurora A endogène pendant 24h, entraîne une augmentation de l'expression de la GFP-AurA qui atteint le niveau d'Aurora A endogène. De plus, la déplétion d'Aurora A endogène dans ces cellules ne déclenche pas de défaut au niveau des pôles et du fuseau montrant que la forme GFP de cette kinase compense efficacement la perte de l'endogène [166].

Pour obtenir une déplétion constante d'Aurora A endogène, nous avons ajouté aux cellules un plasmide qui code pour un shRNA anti-Aurora A endogène. Ces petits ARN ont un faible taux de dégradation et permettent une déplétion efficace et stable du gène cible [252-254]. Ainsi, l'utilisation de ce shRNA permet une diminution significative de l'expression d'Aurora A endogène, l'expression de la GFP-AurA est augmentée ainsi que la phosphorylation de sa thr288 dans les cellules synchronisées en mitose (Figure 25 - C). La quantification relative du niveau totale d'Aurora A dans les cellules montre qu'il est similaire entre la lignée contrôle et la lignée GFP-AURA shARN (Figure 25 - B).

1.2. Caractérisation de la lignée clonage GFP-AURA shARN

Nous avons ensuite vérifié si la déplétion de la kinase endogène et son remplacement par la GFP-AurA ne perturbait pas le cycle cellulaire. Nous avons observé la localisation de la GFP-AurA dans les lignées clonales : GFP-AurA est associée avec les centrosomes en début de mitose, elle localise aux centrosomes et sur les fuseaux mitotiques et centraux de la prométaphase à la télophase et finit par être dégradée en fin de mitose (Figure 26 - A). Ce comportement est le même que celui observé pour Aurora A endogène [64].

Par cytométrie en flux, nous avons évalué la distribution au cours du cycle cellulaire des cellules GFP-AurA shARN (Figure 26 - B). Le pourcentage de cellules en phase G1, S et G2/M est similaire pour la lignée GFP-AurA shARN à la lignée contrôle (Figure 26 - B).

Ainsi, les lignées GFP-AurA shARN présentent une expression de GFP-AURA similaire à Aurora A endogène et un cycle cellulaire comparable à la lignée contrôle. Cette kinase GFP est correctement localisée au cours du cycle et est phosphorylée sur la thréonine 288 en mitose. Ces éléments permettent de dire que la GFP-AurA est fonctionnelle.

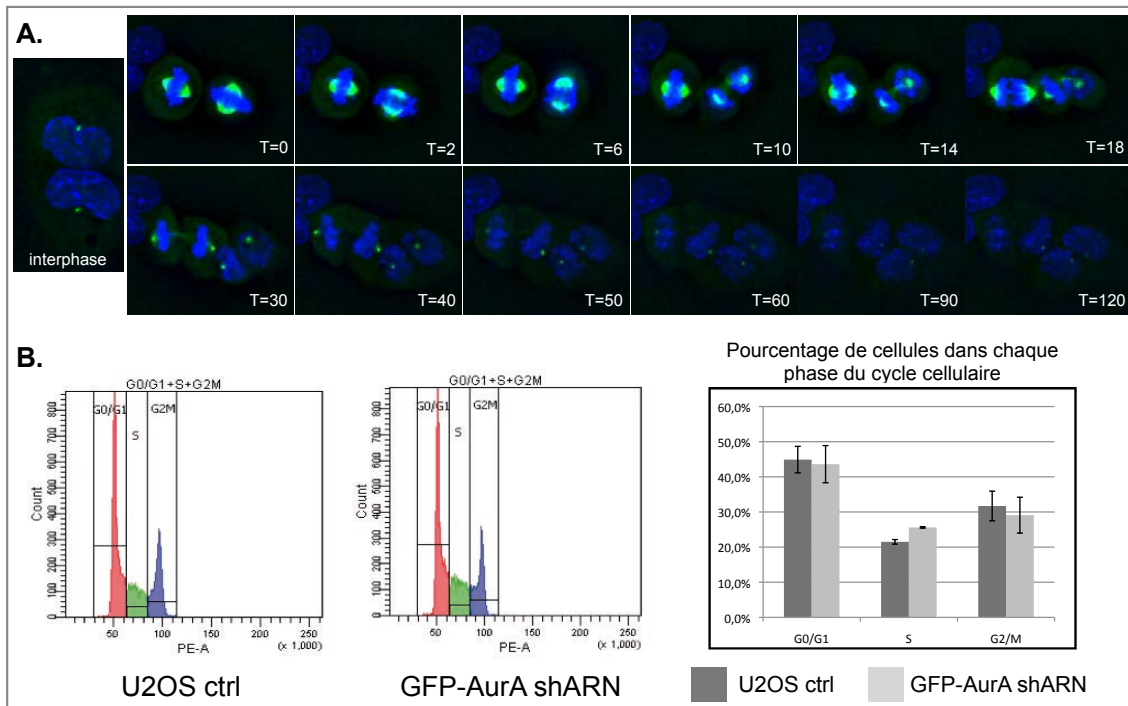


Figure 26 : Caractérisation de la lignée clonale GFP-AURA shARN

A - Images de vidéomicroscopie qui montrent la localisation de GFP-AURA dans la lignée GFP-AURA shARN en cours de mitose : les temps sont mentionnés en minute, la GFP-AURA en vert et l'ADN en bleu. En interphase, la GFP-AURA est localisée au niveau des centrosomes. De la prométaphase à l'anaphase (T=0 à 18 pour la cellule de gauche et T=0 à 6 pour celle de droite) GFP-AURA se localise au niveau des pôles et sur le fuseau mitotique. En télophase (T=30 à gauche, T=10 à 18 à droite), elle se localise sur les centrosomes et le fuseau central puis commence à être dégradée en sortie de mitose (à partir de T=30). B - Résultats d'analyse de cytométrie en flux qui montrent la distribution des cellules au cours du cycle cellulaire. Les cellules GFP-AURA shARN présentent une distribution au cours du cycle similaire à la lignée contrôle U2OS (n=3).

1.3. Caractérisation de l'expression de GFP-as-AurA dans les lignées GFP-as-AurA-shRNA

Dans l'optique d'utiliser l'approche SILAC pour discriminer préférentiellement les substrats d'Aurora A parmi ces interactions, nous avons construit une lignée cellulaire déplétée en Aurora A endogène et remplacée par la GFP-as-AURA exprimée de manière stable à des niveaux physiologiques. L'ajout de l'inhibiteur synthétique 1-NAPP1 peut se faire en parallèle dans les deux : la lignée GFP-AURA shARN insensible à l'inhibition et la lignée GFP-as-AURA shARN sensible à l'inhibition. Ainsi les éventuels effets non spécifiques de l'inhibiteur sont présents dans les deux expériences et les différences de phosphorylation observées sont exclusivement dues à l'inhibition d'Aurora A. La construction de ces lignées suit les mêmes étapes que pour la lignée GFP-AurA shARN. La version as-Aurora A est obtenue *via* la mutation

du résidu gardien de la poche catalytique la leu210 en Ala, un résidu plus petit qui permet l'agrandissement de la poche catalytique (Principe en Figure 27 - A) [166]. Cette technique se base sur le principe de la génétique chimique développée par Kevan Shokat (*University of California, San Francisco, USA*) qui consiste à introduire une mutation fonctionnellement silencieuse dans le site actif d'une kinase la rendant sensible à un inhibiteur chimique spécialement développé pour cette kinase mutée. On obtient donc un système biologique avec une kinase au site actif unique, agrandi pour être spécifiquement inhibé par une molécule encombrante synthétisée à partir d'inhibiteurs connus généralement analogues de l'ATP. L'utilisation de cet inhibiteur qui n'a pas d'autre cible dans la cellule, permet donc d'inhiber spécifiquement la kinase et de distinguer les substrats ciblés par cette kinase parmi l'ensemble du phosphoprotéome exprimé [255].

Ce variant d'Aurora A est aussi actif qu'Aurora A endogène *in vitro* et son activité est inhibée par l'analogue de l'ATP 1-Na-PP1 qui n'a aucun effet sur la version endogène [166]. Comme pour la lignée GFP-AurA, l'expression de la GFP-as-AurA est inférieure à celle de l'endogène. La déplétion par siARN d'Aurora A endogène pendant 24h, entraîne une augmentation de l'expression de la GFP-as-AurA qui atteint le niveau d'Aurora A endogène [166]. L'utilisation du shRNA anti-Aurora A endogène permet une diminution significative de l'expression d'Aurora A endogène lors des premières semaines de sélection cependant son expression reprend après 6 semaines malgré la présence de la sélection (figure 27 - B).

Plus d'une centaine de lignées GFP-as-AurA shARN et GFP-AurA shARN présentant une bonne réduction d'Aurora A endogène ont été sélectionnées. Cette réduction d'Aurora A endogène est systématiquement perdue après environ un mois de culture dans les GFP-as-AurA shARN tandis que les lignées GFP-AurA shARN conservent une réduction significative et constante (Figure 25 - B). Bien que fonctionnelle sur un cycle de 24h, il semblerait que la GFP-as-AurA ne compense pas dans sa totalité l'absence d'Aurora A endogène au cours du temps. En réponse à la présence du shARN, les cellules développent au cours des passages successifs, des mécanismes qui favorisent l'expression d'Aurora A endogène. Ce phénomène n'étant pas observé pour les lignées GFP-AurA, il est vraisemblablement lié à la mutation du site catalytique de la GFP-as-AurA.

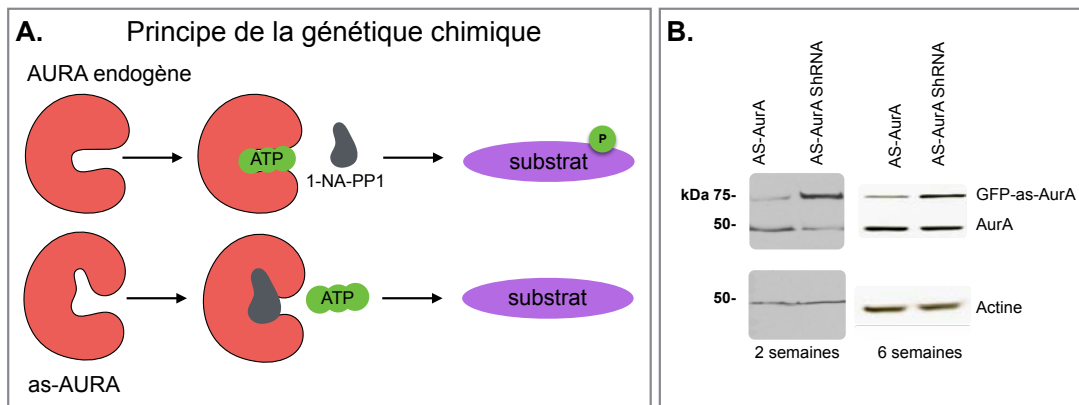


Figure 27 : Caractérisation de l'expression de la GFP-as-AURA

A - Schéma de principe de la génétique chimique : la mutation du résidu gardien de la poche catalytique permet à l'analogue de l'ATP, ici le 1-Na-PP1, d'inhiber l'activité kinase de la protéine mutée mais n'a aucun effet sur la kinase endogène. B - Western-blot montrant le niveau d'expression d'Aurora A dans les lignées GFP-as-AURA et GFP-as-AURA shARN : le niveau d'expression de la GFP-as-AURA augmente avec la déplétion de l'endogène et atteint un niveau comparable à celui de l'endogène dans la lignée GFP-as-AURA. Après 6 semaines de culture, le niveau d'expression d'Aurora A endogène revient au niveau de l'expression d'Aurora A endogène de la lignée sans déplétion. La déplétion n'est pas stable dans le temps malgré la sélection.

2. Construction et analyse de l'interactome

2.1. Purification des complexes protéiques dépendants d'Aurora A

Pour déterminer les partenaires d'interactions d'Aurora A dans des conditions où la kinase est exprimée à des niveaux endogènes, j'ai utilisé la lignée GFP-AurA shARN. Les cellules sont synchronisées en mitose par un traitement au taxol puis lysées (Figure 28). L'analyse par FACS montre que 90% des cellules sont en phase G2/M (Figure 29D). J'ai ensuite purifié les complexes protéiques par immunoprécipitation du *tag* GFP. L'anticorps commercial utilisé est un mélange de deux anticorps monoclonaux présentant une grande spécificité et une forte affinité pour la GFP (Figure 29A) laissant tous les épitopes de la kinase disponibles pour ses partenaires. J'ai également réalisé deux expériences contrôles différentes. Dans la première, j'ai fait une IP de la GFP dans des cellules U2OS sauvages n'exprimant pas la GFP permettant d'identifier les contaminants liés aux réactions croisées de l'anticorps et aux billes (Figure 29A). Dans la seconde expérience contrôle, j'ai transfecté les cellules U2OS avec le plasmide contrôle pEGFP-C1. La GFP est exprimée seule et son IP permet d'identifier les contaminants qui pourraient lui être liés (Figure 29A). J'ai contrôlé par WB le niveau d'expression de la GFP-Aurora A et la GFP dans les lysats cellulaires obtenus à partir des cellules synchronisées. La GFP-Aurora A est exprimée de manière stable et comparable dans les réplicats et le niveau d'expression de la

GFP seule dans l'expérience U2OS-GFP lui est similaire (Figure 29B). J'ai également contrôlé, par western-blot, le statut de phosphorylation de la GFP-Aurora A dans les complexes immunopurifiés. En réalisant des IP de la GFP dans des cellules GFP-Aurora shRNA traitées à l'inhibiteur MLN8237, on montre que l'immunoprécipitation d'Aurora A ne dépend pas de la phosphorylation de sa thr288 bien que celle-ci soit majoritairement phosphorylée en conditions normales (Figure 29C). On peut donc conclure que l'on est capable d'isoler les complexes liés à Aurora A phosphorylée et non phosphorylée et que dans nos conditions la GFP-Aurora A est majoritairement phosphorylée.

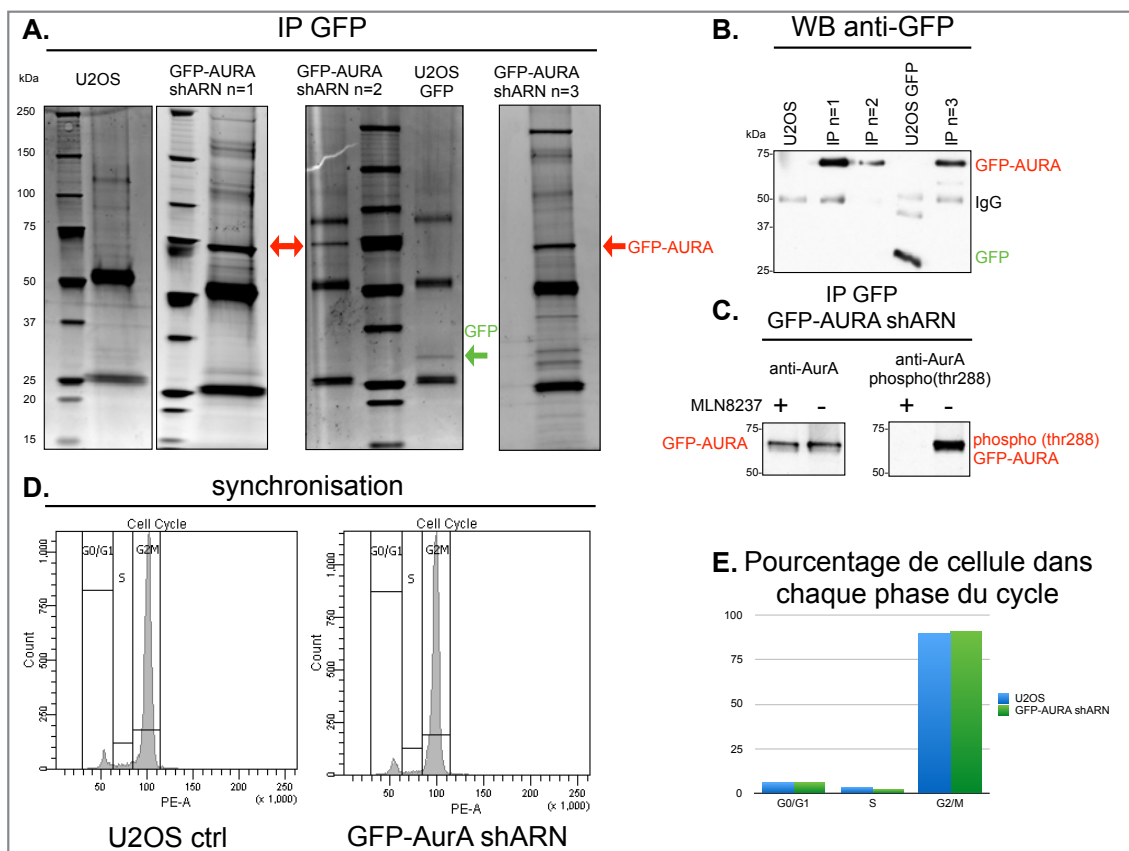


Figure 29 : Purification des complexes protéiques dépendants d'Aurora A

A - Profil des protéines purifiées dans les réplicats et les deux IP contrôles : la GFP-AurA est efficacement purifiée ainsi que la GFP. B - Western-Blot anti-GFP des lisats cellulaires : la GFP-AurA est exprimée à des niveaux similaires dans les trois expériences et l'expression de la GFP dans l'expérience contrôle est comparable. C - Western-Blot anti-GFP d'expérience de purification de GFP-Aurora A en présence et en absence de MLN8237 : dans les conditions contrôles GFP-Aurora A purifiée est majoritairement phosphorylée sur sa thr288 mais sa purification est indépendante de sa phosphorylation. D - Résultats d'analyse de cytométrie en flux qui montrent la distribution des cellules au cours du cycle cellulaire. Le traitement avec 1µg/ml de Taxol pendant 18h permet la synchronisation de 90% des cellules en phase G2/M.

2.2. Identification des partenaires potentiels d'Aurora A

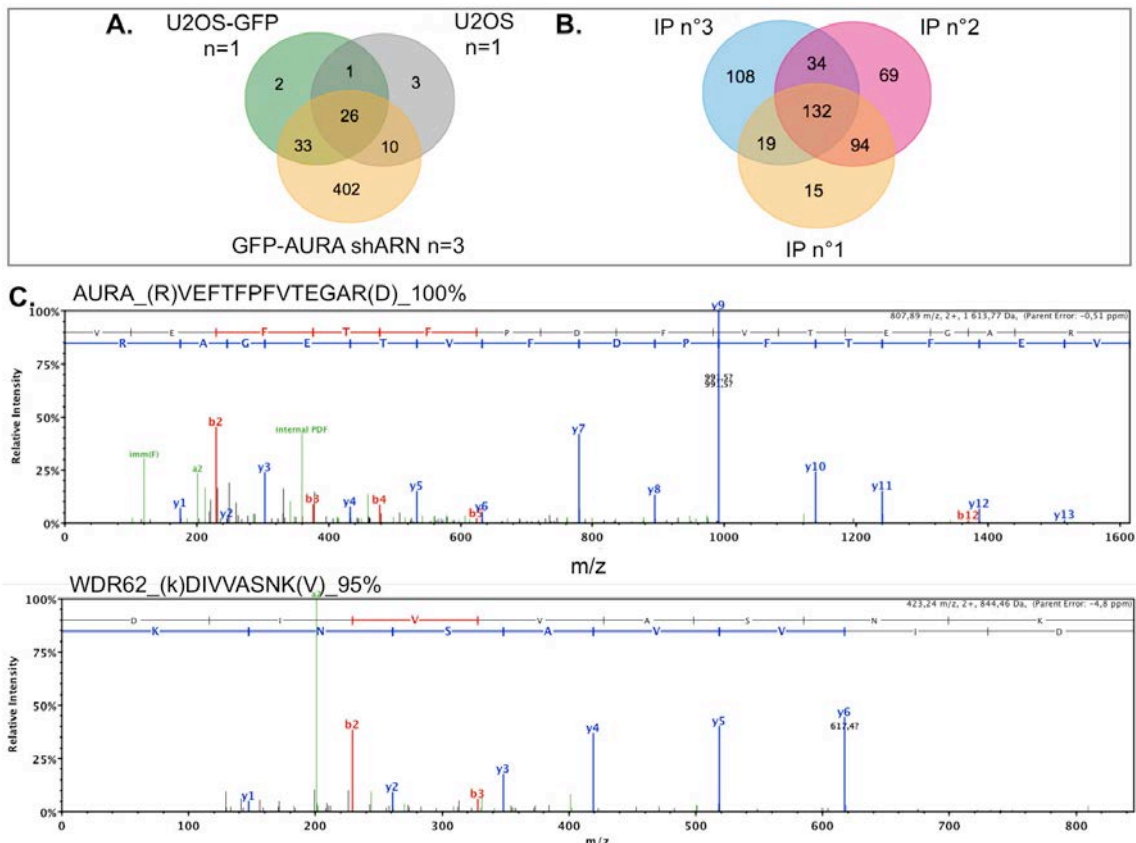


Figure 30 : Identification des partenaires potentiels

A - Diagramme de Venn représentant la répartition des protéines identifiées dans les expériences contrôles et les trois réplicas : les protéines présentes dans les IP contrôles ne représentent que 13% des protéines tandis que 402 protéines sont identifiées dans les complexes purifiés à partir de la GFP-Aurora A montrant ainsi un enrichissement spécifiquement lié à Aurora A. B - Diagramme de Venn représentant la répartition des protéines identifiées dans les trois réplicas : 30% des protéines sont retrouvées dans les trois expériences et 60% sont identifiées dans au moins deux expériences ce qui montre une bonne reproductibilité entre les expériences. C - Spectre MS/MS d'un peptide d'Aurora A ayant une probabilité Scaffold égale à 100% et spectre MS/MS d'un peptide de WDR62 ayant une probabilité Scaffold égale à 95% (WDR62 présente en majorité des spectres de probabilité Scaffold égale à 100%).

L'identification des partenaires potentiels d'Aurora A est faite à partir des trois réplicats biologiques. Les complexes sont isolés *via* la purification de la GFP-AurA dans la lignée GFP-AurA shARN synchronisée en phase M. Les lignées U2OS et U2OS-GFP, c'est à dire transfectée avec le plasmide pEGFP-C1 servent de contrôle (Figure 28).

La couverture moyenne d'Aurora A dans les réplicats est de 78% avec 33 peptides dans l'IP numéro 2 et une cinquantaine dans les deux autres. L'IP contrôle dans les U2OS ne présente pas de peptide détectable d'Aurora A tandis que l'IP dans les U2OS-GFP en présente deux. La GFP est détectée dans les réplicats et l'IP U2OS-GFP avec en moyenne une quinzaine de peptides et est absente de l'IP U2OS contrôle. Deux spectres de peptides fragmentés d'Aurora A et de WDR62 représentatifs des spectres ayant une probabilité Scaffold de 100% et 95% sont

présentés sur la figure 30C. La répartition des protéines identifiées dans les IP contrôles et les réplicats montre que il y a un fort enrichissement des complexes spécifiques d'Aurora A avec 84% des protéines identifiées non retrouvées dans les contrôles (Figure 30A). La répartition des protéines entre les trois IP montre que 30% des proies sont retrouvées dans les trois expériences et environ 60% des proies sont identifiées dans au moins deux expériences ce qui représentatif d'une reproductibilité correcte (Figure 30B).

2.3. Classification des partenaires potentiels d'Aurora A

Les partenaires potentiels d'Aurora A sont classés en 4 catégories selon leur probabilité d'être une vraie interaction (Pv) définie à partir de l'analyse SAINT en se basant sur probabilités moyennes (AvgP) et maximales (MaxP) calculées avec le nombre total de spectres de chaque proie dans chaque expérience. Ainsi 180 partenaires présentent une forte Pv soit 38% des protéines identifiées (partenaires en verts sur la Figure 31, Figure 32). Dans cette catégorie, on retrouve 9 partenaires connus d'Aurora A (Contour bleu dans la Figure 31) dont ses activateurs TPX2, NPM et CEP192 et 15 protéines décrites dans l'introduction comme essentielles au cycle cellulaire mais sans évidence d'interaction directe avec Aurora A (Contour noir dans la Figure 31). La deuxième catégorie représente les partenaires ayant une Pv moyenne (jaune dans la Figure 31), on trouve 74 protéines soit 15% des partenaires potentiels aucun partenaire connu n'est présent et trois sont essentiels au cycle cellulaire. Dans la catégorie des Pv faibles (orange dans la Figure 30), j'ai classé 194 partenaires soit 41% des protéines identifiées dont 3 partenaires connus d'Aurora A : GEF-H1, MCAK et Eg5 et 6 protéines du cycle cellulaire. En dernière catégorie, les partenaires présentant une Pv nulle (rouge dans la Figure 31), on trouve 28 partenaires soit 6% des protéines identifiées et le partenaire connu RALA. La présence de RALA dans cette catégorie est liée au fait que 5 spectres issus de sa fragmentation sont comptabilisés dans l'expérience contrôle U2OS-GFP alors qu'au maximum deux sont comptabilisés par réplicat.

La majorité des partenaires connus et identifiés est classée dans la catégorie des partenaires présentant une forte probabilité d'être une vraie interaction ce qui représente une première validation de notre approche. Ainsi nous avons identifié 171 nouveaux potentiels partenaires directs d'Aurora A. Pour valider plus solidement notre approche, j'ai choisi d'étudier l'interaction *in vivo* entre Aurora A et deux nouveaux partenaires.

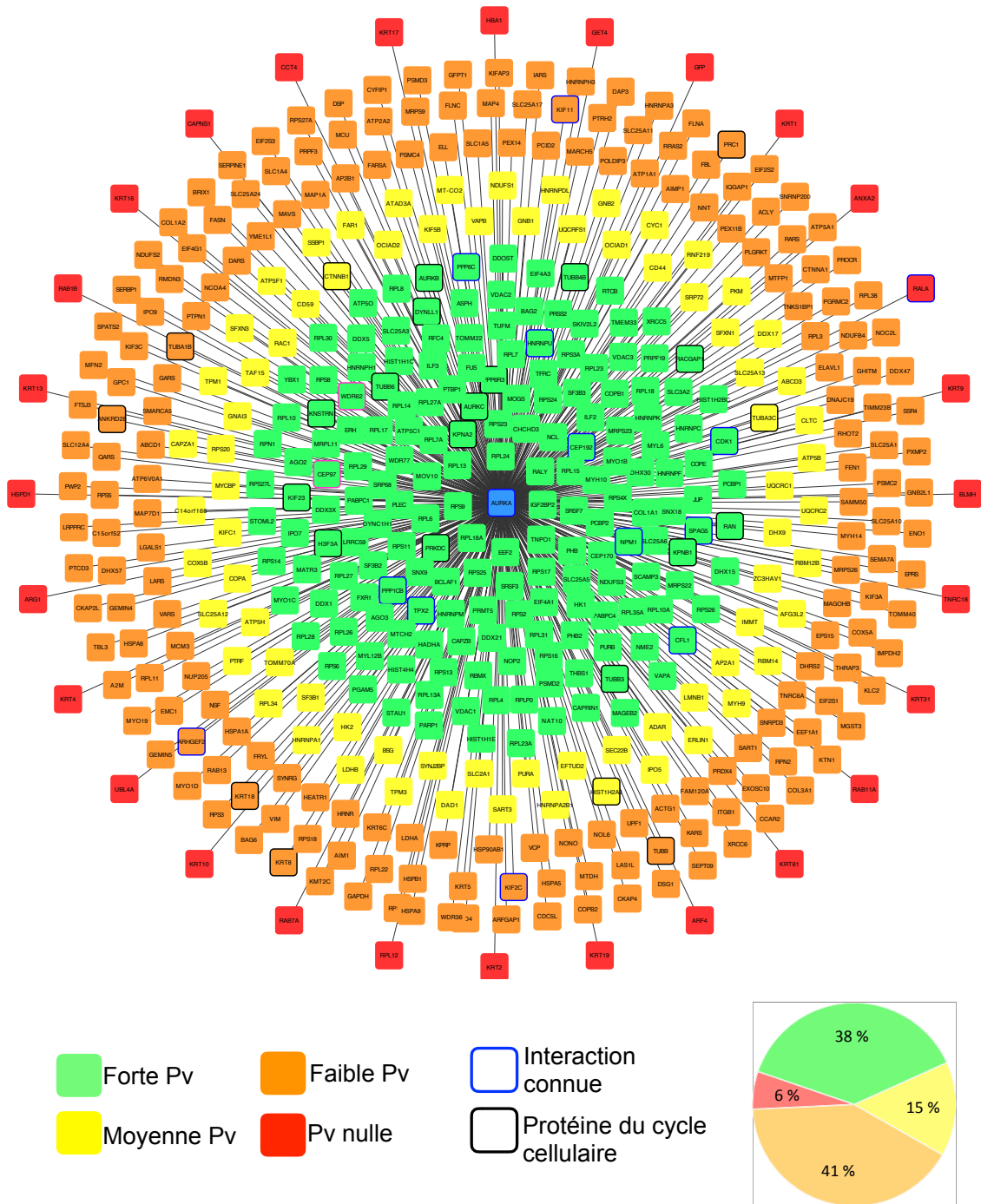


Figure 31 : Classification des partenaires potentiels d'Aurora A

Représentation en rosace des partenaires potentiels d'Aurora A classés en fonction de leur score SAINT : en vert sont représentées les interactions classées comme ayant une forte Pv avec une AvgP > 0,5 et MaxP > 0,9; en jaune les Pv moyennes ayant une AvgP > 0,5 ou une MaxP > 0,9; en orange les Pv faibles avec une 0,5 > AvgP > 0 et en rouge les Pv nulles avec une AvgP = 0. Aurora A est représentée au centre en bleu et les proies entourées de bleu sont des partenaires connus de la kinase tandis que celles entourées de noir sont des protéines décrites comme essentielles au cycle cellulaire. Le diagramme circulaire montre la proportion de chaque catégorie par rapport au nombre total de protéine identifiées (477 partenaires potentiels).

Sur la base de leur Pv, leur localisation aux centrosomes et le faible nombre d'études à leur sujet, j'ai choisi les protéines WDR62 et CEP97. Ces deux partenaires sont présents dans les trois réplicats, absents des IP contrôles et présentent une forte Pv.

2.4. Analyse de l'interactome

A partir des 180 protéines de la première catégorie, j'ai créé un sous réseau représenté centré sur Aurora A (Figure 32). La taille des noeuds est proportionnelle à l'AvgP des partenaires. Les protéines choisies pour l'étude *in vivo* CEP97 et WDR62 ont une AvgP élevée, égale à 1 pour CEP97 et 0,97 pour WDR62. Les partenaires connus présentent des AvgP réparties entre 0,5 et 1. Ainsi l'AvgP est égale à 0,77 pour TPX2, 0,88 pour la NPM1 et 0,6 pour CEP192, toutes trois étant des activateurs bien caractérisés d'Aurora A. D'autres protéines du cycle cellulaire présentent une AvgP élevée. Ainsi, celle d'Aurora C est égale à 1 et celle d'Aurora B égale à 0,67 montrant qu'Aurora A pourrait entrer en interaction avec ses homologues et pourrait participer à leur régulation en les phosphorylant par exemple notamment à partir de l'anaphase au niveau du fuseau central et du corps médian où elles sont toutes trois localisées. D'ailleurs les protéines KIF23 et RACGAP1 composant le complexe centralspindlin présentent une AvgP élevée, égale à 0,97 pour KIF23 et 0,61 pour RACGAP1. La GTPase Ran ainsi que les importines α/β (KPNA2 et KPNB1) font également partie des partenaires d'interaction d'Aurora A avec des AvgP égales à 0,64; 0,65 et 0,63 respectivement. Enfin la sous-unité régulatrice de la phosphatase PP6, PP6R3 présente une AvgP égale à 0,65 et pourrait être le lien par lequel Aurora A régule l'activité de la principale phosphatase de sa boucle d'activation lorsqu'elle est en complexe avec TPX2.

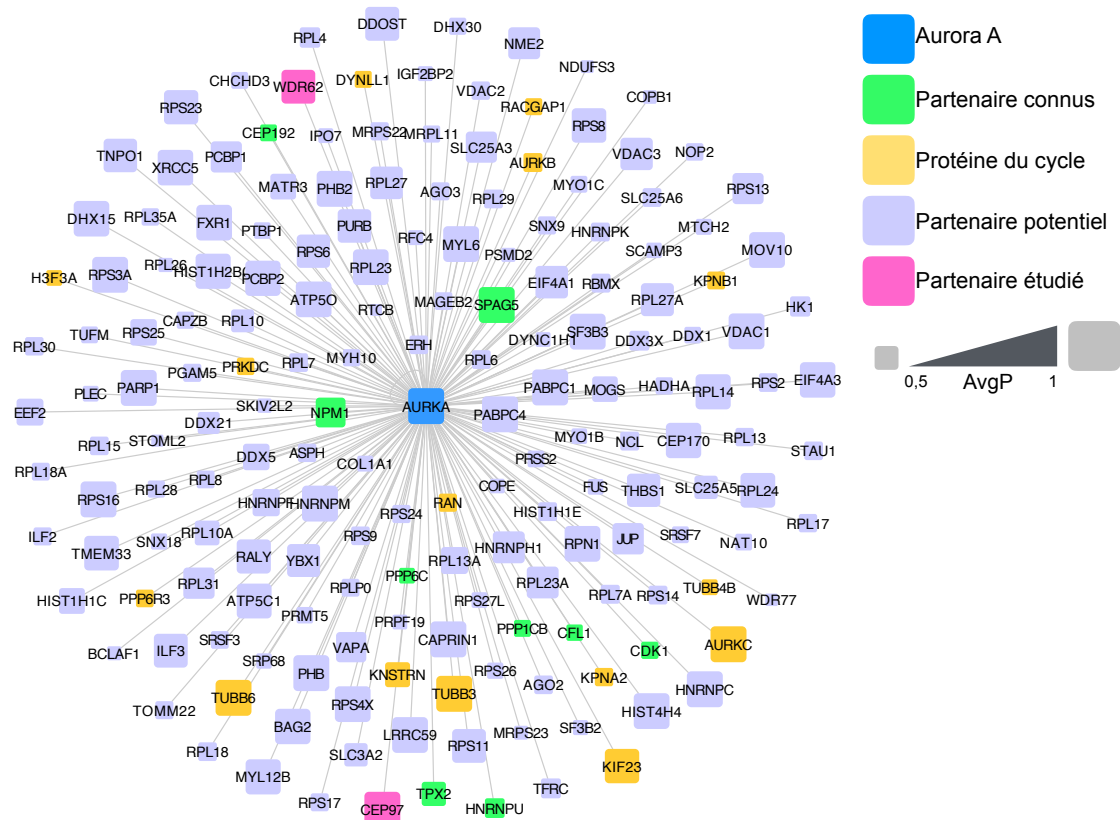


Figure 32 : Représentation des 180 partenaires de première catégorie

Représentation en rosace des 180 partenaires identifiés présentant une forte probabilité d'une vraie interaction : la taille des noeuds est proportionnelle à leur AvgP, au centre en bleu est représentée Aurora A, en vert ses partenaires connus, en jaune les protéines décrites dans le cycle cellulaire, en rose les partenaires étudiés *in vivo* et en gris les autres partenaires potentiels. Les protéines choisies pour être étudiées *in vivo* présentent une haute AgP, égale à 0,97 pour WDR62 et 1 pour CEP97. L'AvgP des partenaires connus est bien répartie entre 0,5 et 1 : elle est égale à 0,77 pour TPX2 , à 0,88 pour la NPM1 et 0,6 pour CEP192.

Avec l'application BisoGenet, j'ai généré un réseau d'interaction entre ces 180 partenaires de forte Pv. En sélectionnant toutes les bases de données disponibles et toutes les techniques d'identification des interactions, 1377 interactions sont répertoriées entre ces 180 partenaires (Figure 33 - A). Parmi ces 180 partenaires, 164 forment un réseau dense tandis que 12 protéines ne présentent pas d'interaction répertoriée avec ce réseau (Figure 33 - D). Ainsi les SKAP (KNSTRN) et CEP97 n'ont pas d'interaction répertoriée, les protéines Sorting nexin 9 et 18 interagissent entre elles comme les protéines extracellulaires, la collagène- $\alpha 1$ 21 et la trombospondine (Figure 33 - D). L'utilisation de l'application MCODE, un algorithme de regroupement, a permis d'isoler un regroupement de 35 protéines présentant 545 interactions entre elles. Ce sous-réseau correspond à des protéines ribosomales en complexe (Figure 33 - A). Bien que communément considérées comme des contaminants, les protéines ribosomales sont essentielles à la traduction des protéines et donc à la traduction d'Aurora A. La question est maintenant de déterminer si l'interaction d'Aurora A avec ce complexe a lieu lors de sa traduction ou si elle joue un rôle direct dans la régulation de la traduction des ARNm.

Enfin, l'isolation des premiers partenaires voisins en interaction avec Aurora A à partir des interactions répertoriées dans les bases de données constitue un sous-réseau de 26 protéines et 113 interactions (Figure 33 - C). Parmi ces protéines on trouve les activateurs forts d'Aurora A TPX2, NPM1 et CEP192 ainsi que les sous-unités catalytiques des phosphatases PP1 et PP6. Aurora B et la sous-unité régulatrice de la phosphatase PP6 présentent également des interactions avec Aurora A répertoriées dans les bases de données. Ainsi, 17 des partenaires classés dans la première catégorie ont au moins une interaction répertoriée avec Aurora A ce qui représente avec les partenaires connus et protéines du cycle, 14% des interactions que nous mettons en évidence et constitue une seconde validation de notre approche.

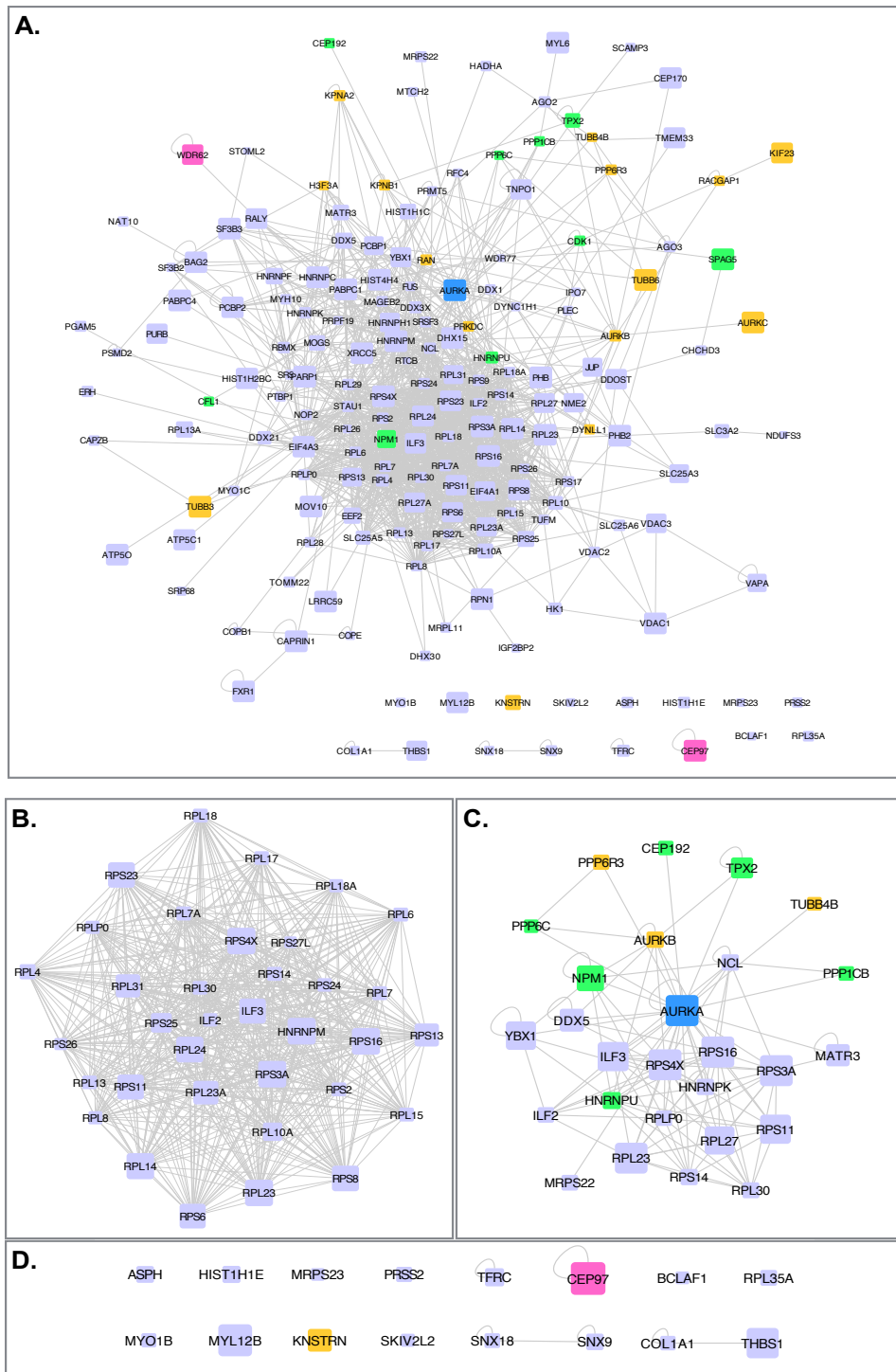


Figure 33 : Interactome des 180 partenaires de forte Pv

A - Représentation schématique de l'interactome des 180 partenaires de première catégorie construit à partir de l'application BisoGenet : 164 protéines forment un réseau dense de 1373 interactions répertoriées. B - L'analyse des regroupements avec l'application MCODE permet d'isoler un sous-réseau contenant 35 protéines et 545 interactions : ce sous-réseau correspond aux protéines ribosomales. C - L'isolement des premiers voisins d'Aurora A permet d'isoler un sous-réseau de 26 partenaires et 113 d'interactions répertoriées dans les bases de données soit 14% des partenaires classés dans la première catégorie dont 6 partenaires connus et 3 protéines décrites dans le cycle cellulaire. D - 12 protéines ne présentent pas d'interaction répertoriée dont la SKAP et CEP97 tandis que 4 protéines interagissent deux à deux : les Sorting nexin 9 et 18 et les protéines extracellulaires la collagen-alpha1 21 avec la Thrombospondin 1.

2.5. Annotation et enrichissement en GO

L'annotation et l'analyse de l'enrichissement des GO de réseau d'interaction permet de révéler les attributs communs que partagent les partenaires du réseau et si certaines fonctions cellulaires se dessinent (Figure 34). Ainsi une première analyse avec les GO compartiments cellulaires permet de mettre en évidence la présence de nombreux partenaires associés aux termes fuseau et corps médian, deux localisations où l'on trouve Aurora A en cours de mitose.

On observe un enrichissement des termes regroupés sous le terme noyau. Il est connu qu'Aurora A présente une localisation nucléaire principalement mise en évidence dans les cellules cancéreuses où elle perturbe l'activité de facteurs de transcription.

L'enrichissement en termes regroupés sous les GO complexes ribonucléoprotéiques, splicéosome et granules ribonucléoprotéiques, des compartiments retrouvés dans le noyau et impliqués dans la régulation des ARNm, laisse penser que Aurora A et ses partenaires nucléaires ont une implication dans ces mécanismes. L'enrichissement en termes regroupés sous le terme ribosomes est en lien avec le regroupement isolé avec MCODE; ainsi la question reste de savoir si ces partenaires sont impliqués dans la traduction d'Aurora A ou si Aurora A participe à la régulation du complexe voir les deux possibilités en même temps.

Enfin l'enrichissement en termes regroupés sous le GO mitochondrial nucléoïde montre qu'un nombre significatif de protéines de l'intéactome sont localisées au niveau de la mitochondrie supportant l'idée d'une implication directe d'Aurora A dans les fonctions mitochondriales.

Pour préciser ces premières observations j'ai analysé le réseau défini par l'enrichissement des GO processus biologiques (Figure 35). Le sous-réseau le plus dense est lié à la régulation de la traduction et de l'épissage des ARNm ce qui est consistant avec les GO des compartiments cellulaires puisque ces fonctions ont lieu au sein des complexes ribonucléoprotéiques. Trois sous réseaux indépendants sont également liés à la régulation des ARNm : la stabilisation de ARNm, le traitement des ARN ribosomiques et le ciblage à la membrane SRP-dépendant, un processus de ciblage des protéines au reticulum endoplasmique qui a lieu lors de la traduction *via* le récepteur SRP (*signal-recognition particle*). Ainsi 4 sous-réseaux sur 6 sont liées à la régulation des ARNm. Le sous-réseau assemblage du fuseau central constitue également un groupe intéressant car on connaît l'implication d'Aurora A dans ce processus, mais il reste difficile à étudier (voir la fonction d'Aurora A au fuseau central). Enfin le dernier sous-réseau significatif est lié à des fonctions mitochondriales.

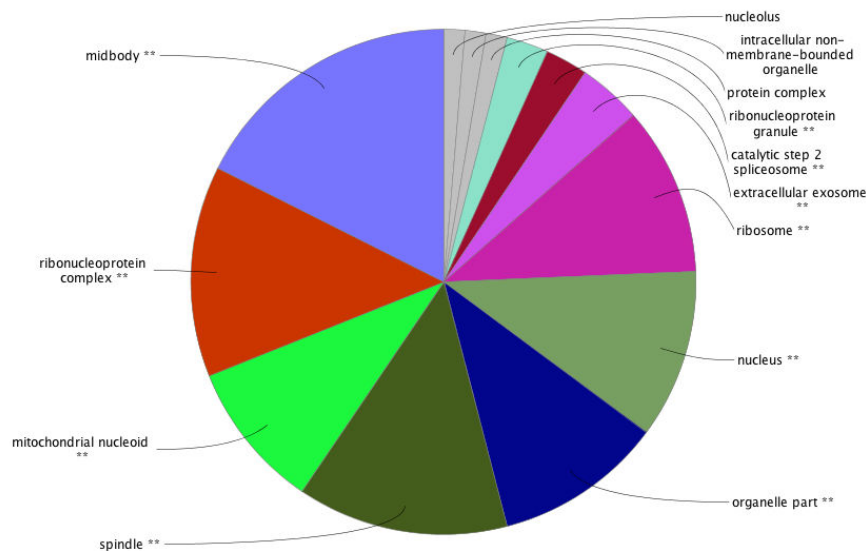


Figure 34 : Compartiments cellulaires représentatifs des partenaires d'Aurora A

Diagramme circulaire représentant les groupes fonctionnels définis par ClueGO à partir de GO compartiments cellulaires attribués aux 180 protéines de première catégorie, les deux astérisques représentent une valeur-p inférieure à 0,001, le nom du groupe fonctionnel est donné par le terme le plus significatif du groupe et la taille des parts est proportionnelle aux nombres de termes retrouvés dans chaque groupe. Les partenaires d'Aurora A localisent principalement au niveau du fuseau et du corps médian, des complexes ribonucléoprotéiques et des ribosomes, du noyau et des mitochondries.

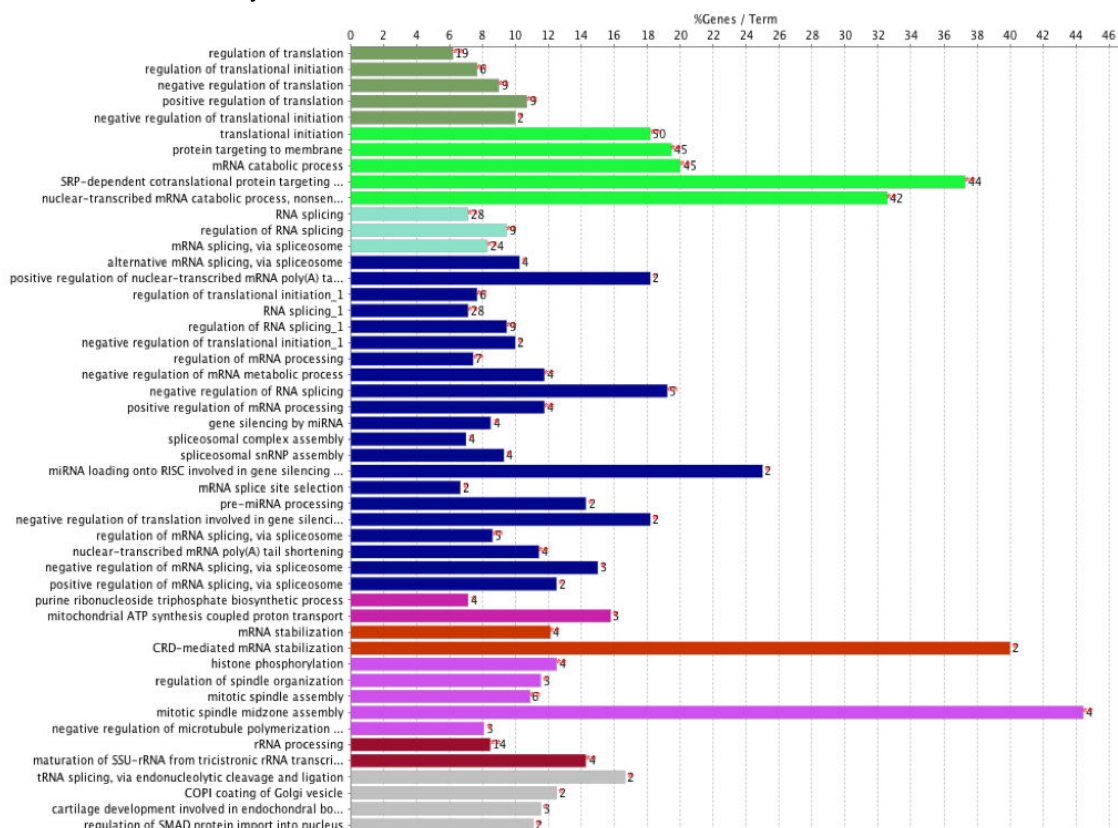


Figure 35 : Processus biologiques significativement enrichis au sein de l'interactome d'Aurora A

A - Visualisation des processus biologiques significativement enrichis *via* le calcul de l'application ClueGO. La taille des barres est proportionnelle au pourcentage de gènes présent retrouvé dans chaque terme. De nombreux termes sont liés aux mécanismes de régulation des ARN. Un groupe est lié à l'assemblage du fuseau mitotique une fonction bien décrite d'Aurora A. Un groupe plus restreint est en lien avec des fonctions mitochondriales.

3. Analyse du partenaire de liaison WDR62

3.1. WDR62

J'ai choisi d'étudier WDR62 pour deux raisons : elle présente des fonctions mitotiques similaires à celles d'Aurora A et est associée à la microcéphalie.

Comme pour Aurora A, il a été montré que WDR62 joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire [256, 257]. Son expression est significativement élevée dans les cancers gastriques et ovariens et cette surexpression est corrélée avec une amplification des centrosomes et un mauvais pronostic [258, 259]. Elle est également impliquée dans la division symétrique des neuroblastes, nécessaire à leur prolifération ainsi que dans la migration neurale [260]. En effet, WDR62 est principalement exprimée, lors du développement du cerveau, dans les neuroblastes et les neurones post-mitotiques. Des mutations du gène codant cette protéine sont associées avec la microcéphalie primaire autosomique récessive (MCPH) et d'autres anomalies du cortex. Avec plus de 30 mutations identifiées, WDR62 est le second gène le plus fréquemment muté dans la MCPH [261, 262]. La MCPH est un trouble du développement neurologique d'origine génétique hétérogène rare, caractérisée par un périmètre crânien réduit à la naissance sans anomalies notables de l'architecture cérébrale et avec un déficit intellectuel variable. (www.orpha.net) La plupart des protéines identifiées dans le développement de la MCPH sont, à un moment du cycle cellulaire, localisées sur les centrosomes [263, 264]. Elles sont notamment impliquées dans la biogenèse des centrioles, la maturation des centrosomes ou le positionnement du fuseau. Bien que des fonctions non mitotiques des protéines centrosomales peuvent contribuer au développement de la MCPH, l'organisation et la régulation du fuseau mitotique semble être des processus cruciaux pour la survie des neuroblastes et leur devenir [264].

WDR62 est une grosse protéine échafaudage, contenant en partie N-terminale, 15 domaines WD40 répétés, responsables des interactions protéine-protéine tandis que la partie C-terminale est fortement phosphorylée et sert de zone régulatrice [257].

Lorsque j'ai commencé l'étude de cette protéine en lien avec Aurora A, aucune évidence de leur interaction n'avait été publiée. En 2014, Chen et al. publient un article dans Nature Communications qui rapporte que WDR62 s'associe et régule Aurora A [265]. A partir d'un modèle de souris mutantes, ils montrent que WDR62 interagit spécifiquement avec Aurora A et TPX2 qui se lient au niveau de sa région centrale (621-1138 AA). En mitose, ces trois protéines colocalisent au niveau des pôles et du fuseau mitotique. Les cellules issues des souris mutantes déplétées en WDR62 présentent des défauts d'assemblage du fuseau, des fuseaux multipolaires et une

régulation négative du niveau d'expression d'Aurora A. L'interaction de WDR62 avec Aurora A et TPX2 favorise l'activité de la kinase. Enfin WDR62 et Aurora A interagissent génétiquement pour réguler la mitose [265]. Par la suite, Lim et al montrent qu'Aurora A et WDR62 colocalisent au niveau du fuseau dans les cellules en culture et Aurora A phosphoryle cinq résidus de la partie N-terminale de WDR62 [266]. Lors de l'expression ectopique de WDR62, ses phosphorylations modulent son association avec les microtubules en interphase et mitose.

Lors de mon analyse de l'interaction entre Aurora A et WDR62, j'ai mis en évidence que l'activité kinase d'Aurora A modulait la localisation de WDR62 au niveau des pôles.

3.2. Aurora A interagit avec WDR62 en mitose

Dans un premier temps, l'analyse de l'interactome montrent que WDR62 est un partenaire majeur d'Aurora A. Jusqu'à 405 spectres sont associés à son identification avec une couverture moyenne de 22% et 33 peptides uniques. Ainsi, les probabilités calculées avec SAINT sont élevées : l'AvgP est égale à 0,96 et une MaxP égale à 1.

3.3. Aurora et WDR62 colocalisent *in vivo*

J'ai confirmé la colocalisation d'Aurora A et WDR62 dans les cellules en mitose. Le marquage par immunofluorescence de WDR62 et Aurora A endogènes, dans des cellules HeLa et U2OS, montre que Aurora A et WDR62 colocalisent principalement au niveau des pôles en mitose (Figure 36).

3.4. La déplétion de WDR62 ne perturbe pas Aurora A

Comme le montre le western-blot de la figure 36-B, la déplétion de WDR62 par siARN pendant 48h est efficace (Figure 37 - B). Dans ces conditions, l'expression d'Aurora A n'est pas perturbée contrairement à ce que l'équipe de Chen et al. a rapporté pour les MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) [265]. De plus, l'analyse des images d'immunofluorescence montre que la déplétion par siRNA de WDR62 ne perturbe pas la localisation d'Aurora A au niveau des pôles et sur le fuseau mitotique (Figure 37 - A). Dans les lignées humaines, la stabilité et la localisation d'Aurora A ne semblent pas dépendre de WDR62.

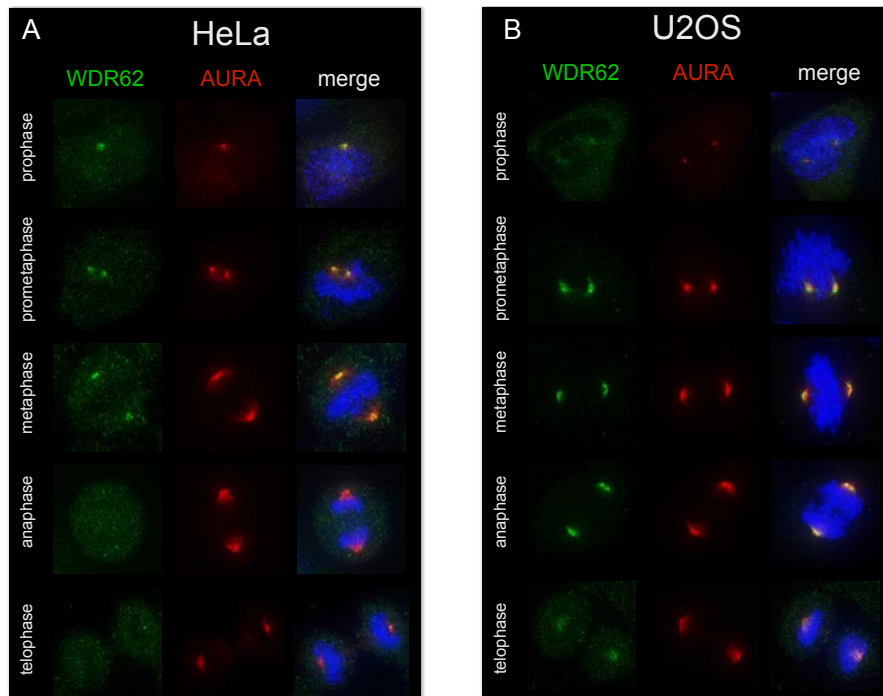


Figure 36 : Aurora A et WDR62 colocalisent au niveau des pôles

Images de cellules HeLa (A) et U2OS (B) fixées, immunomarquées montrant la localisation de WDR62 et Aurora A en mitose. Les images sont une projection maximum du plan z, WDR62 est en vert, Aurora A en rouge et l'ADN en bleu.

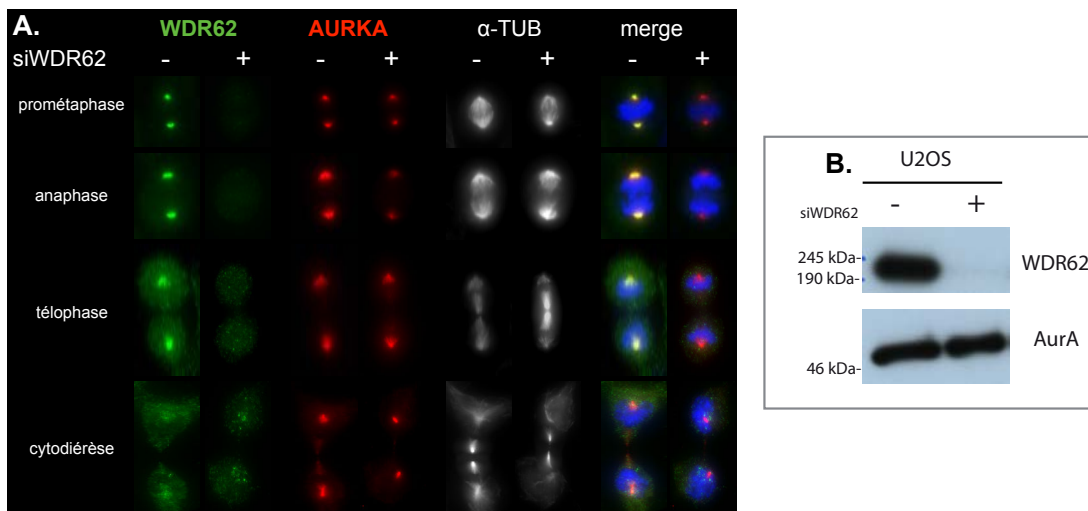


Figure 37 : La déplétion de WDR62 n'affecte pas Aurora A

A : projection maximum d'image de microscopie de cellules U2OS fixées, immunomarquées. La déplétion de WDR62 par siARN pendant 48h ne perturbe pas la localisation d'Aurora A au niveau des pôles et du fuseau mitotique. WDR62 en vert, Aurora A en rouge, l' α -tubuline en blanc et l'ADN en bleu.

B : Analyse par western blot de la quantité d'Aurora A et WDR62. La déplétion de WDR62 est complète et la quantité d'Aurora A reste inchangée.

3.5. L'inhibition d'Aurora A entraîne la délocalisation de WDR62

La quantification des western-blots des extraits de cellules dont l'activité kinase d'Aurora A est inhibée *via* un traitement au MNL8237, montre que la quantité d'Aurora A est augmentée tandis que celle de WDR62 reste la même. (Figure 38 - A)

L'analyse des images d'immunofluorescence des cellules traitées à l'inhibiteur d'Aurora A montre que la localisation de WDR62 aux pôles est perturbée. WDR62 n'est plus localisée sur les pôles mais est présente dans le cytoplasme. La localisation d'Aurora A est également perturbée, on en retrouve dans le cytoplasme bien qu'une population soit toujours présente au niveau des pôles, (Figure 38 - B). Avec un traitement d'image, le nombre « d'objets » de WDR62, soit son association au niveau des pôles, peut être quantifié (Figure 38 - C). Ainsi dans les cellules HeLa contrôles, on retrouve majoritairement deux objets de WDR62 (41/47 cellules), c'est à dire que WDR62 est associée aux deux pôles de la cellule. Dans les cellules traitées, on retrouve plus de la moitié des cellules présentant zéro (27/75) ou un (11/75) objet WDR62 ce qui traduit la perte de localisation de WDR62. La valeur p du test exact de Fisher étant inférieure à 1%, ce phénotype de perte de localisation de WDR62 est bien lié à l'inhibition d'Aurora A.

3.6. Aurora A phosphoryle WDR62 *in vitro*

La perte de localisation de WDR62 *via* l'inhibition d'Aurora A nous amène à penser que WDR62 pourrait être un substrat d'Aurora A. Lim et al. ont identifié des sites de phosphorylations de WDR62 par Aurora A sur sa partie N-terminale et leur mutation ne perturbe pas sa localisation au niveau des pôles tandis que Chen et al. ont montré qu'Aurora A et TPX2 interagissaient avec la région centrale de WDR62. De notre côté, nous avons fait des tests kinases *in vitro* avec la partie C-terminale de WDR62 (630 derniers AA). L'autoradiographie montre que la partie C-terminale de WDR62 est fortement phosphorylée *in vitro* par Aurora A (Figure 38 - D). L'analyse par spectrométrie de masse des tests d'activité kinase a permis d'identifier deux régions riche en phosphosérines : la région 1090-1100 et la région 1305-1315 (Figure 38 - E). La région 1090-1100 est bien conservée entre les espèces et présente le motif consensus de phosphorylation par Aurora A. La région 1305-1315 bien que moins conservée que la première contient deux sérines conservées et une séquence proche du motif consensus d'Aurora A.

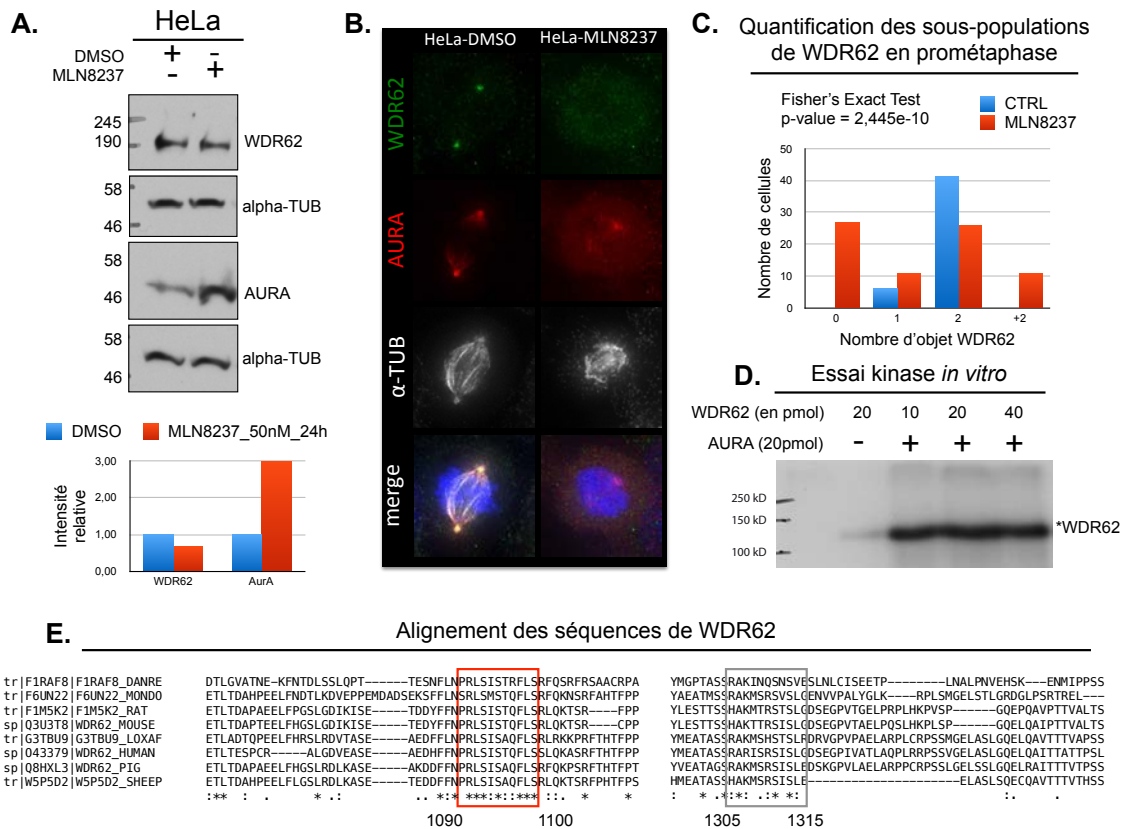


Figure 38 : L'inhibition d'Aurora entraîne la perte de localisation de WDR62 aux pôles

A - Analyse par western-blot et quantification de la quantité d'Aurora A et WDR62 : l'inhibition d'Aurora A entraîne une augmentation de la quantité d'Aurora A et une faible perte de WDR62. B - projection maximum d'images de microscopie de cellules HeLa fixées, immunomarquées : WDR62 en vert, Aurora A en rouge, l' α -tubuline en blanc et l'ADN en bleu. L'inhibition d'Aurora A par le MLN8237 perturbe sa localisation ainsi que celle de WDR62 au niveau des pôles. C - Histogramme présentant les résultats de l'analyse du nombre « d'objet » de WDR62 dans les images d'immunofluorescence. L'inhibition d'Aurora A entraîne une perte significative de l'association de WDR62 au niveau des pôles. D - Autoradiographie montrant la phosphorylation *in vitro* de la partie C-terminale de WDR62. E - Alignement des séquences protéiques de WDR62 de différentes espèces : les zones entourées sont les zones où des sites de phosphorylations ont été identifiés par spectrométrie de masse. La zone en rouge présente le motif consensus de phosphorylation par Aurora A.

3.7. Discussion sur WDR62

WDR62 est un partenaire d'interaction d'Aurora A qui colocalise avec elle au niveau des pôles au cours de la mitose dans les cellules HeLa et U2OS. Contrairement aux données de Chen et al., la déplétion de WDR62 ne perturbe pas le niveau d'expression d'Aurora A et la localisation d'Aurora A dans les cellules HeLa. Lim et al. ont montré qu'Aurora A phosphorylait WDR62 au niveau de sa partie N-terminale et régulait son association avec les microtubules du fuseau mais ne perturbait pas son accumulation au niveau des pôles. Nous n'avons pas observé d'association de WDR62 endogène avec le fuseau, par contre l'inhibition de l'activité kinase d'Aurora A perturbe l'accumulation de WDR62 au niveau des pôles. Il a été montré que cette accumulation lors de la mitose est nécessaire à l'expansion et le maintien des cellules

souches neurales [267]. En effet, WDR62 est nécessaire à la progression de la mitose et l'assemblage du fuseau [257, 267]. La perte de localisation de WDR62 suite à l'inhibition de l'activité kinase d'Aurora A suggère qu'Aurora A régule WDR62 *via* sa phosphorylation sur d'autres sites que ceux mis en évidence précédemment ou *via* la phosphorylation d'autres protéines impliquées. Nous avons montré qu'Aurora A phosphoryle *in vitro* la partie C-terminale de WDR62 sur deux régions riches en sérines. Ces phosphorylations pourraient jouer un rôle sur la régulation de la localisation de WDR62 au niveau des pôles. L'expression de versions mutantes de WDR62 dans lesquelles ces sérines sont remplacées par des résidus non phosphorylables et phosphomimétiques permettrait de répondre à cette question. La production d'anticorps dirigés contre ses régions phosphorylées serait également un moyen de suivre la régulation de WDR62 *in vivo*. Chen et al montrent que WDR62 interagit également avec TPX2. Aurora A phosphoryle également TPX2, aussi son inhibition empêche cette phosphorylation qui pourrait être impliquée dans la régulation de la localisation de WDR62. Enfin, toujours dans cette étude, ils montrent que WDR62 en interaction avec TPX2 et Aurora A améliore l'activité d'Aurora A, créant possiblement une boucle d'amplification dans laquelle Aurora A plus active recruterait WDR62 en la phosphorylant, ce qui l'activerait à son tour. L'absence de cette boucle d'amplification positive notamment dans la microcéphalie perturberait l'activité d'Aurora A et entraînerait des défauts conséquents dans la mitose. A l'inverse, l'amplification de cette boucle d'activation, notamment dans les cellules cancéreuses surexprimant WDR62, pourrait conduire à la transformation des cellules *via* la dérégulation de l'activité d'Aurora A.

4. Analyse du partenaire de liaison CEP97

4.1. CEP97

CEP97 anciennement appelée LRRIQ2 (*Leucine-rich repeat and IQ domain-containing protein 2*) est caractérisée pour la première fois en 2007 par Spektor et al. lors de l'analyse des partenaire de CP110 [268]. Dans cette étude, ils montrent que la déplétion de CEP97 perturbe les fonctions normales des centrioles conduisant à la formation inappropriée d'une structure semblable à un cil primaire. En plus de ce phénotype en interphase, la déplétion de CEP97 entraîne des défaut de fuseau mitotique et de cytotérièse des phénotypes également observés lors de la déplétion de CP110. Ainsi le complexe CP110 -CEP97 est impliqué dans l'inhibition de la formation du cil et sa résorption avant l'entrée en mitose [10].

Comme décrit le cil est une structure qui sert d'antenne à la cellule et des défauts au niveau de cette structure sont associés aux ciliopathies [269]. De plus, la formation et le désassemblage du cil sont des événements étroitement liés au cycle cellulaire qui pourraient conditionner le bon déroulement de la mitose [16, 270].

4.2. Aurora A interagit avec CEP97 en mitose

Dans un premier temps, l'analyse de l'interactome montre que CEP97 est un partenaire majeur d'Aurora A. Jusqu'à 30 spectres sont associés à son identification avec une couverture moyenne de 12% et 9 peptides uniques. Ainsi, les probabilités calculées avec SAINT sont élevées, l'AvgP et la MaxP étant égales à 1.

4.3. Aurora et CEP97 colocalisent *in vivo*

Dans les cellules U2OS en interphase, Aurora A et CEP97 sont situées au niveau des pôles mais ne colocalisent que partiellement. En mitose, l'expression de CEP97 augmente et forme deux points bien définis au niveau de chaque pôle où elle colocalise avec Aurora A (Figure 39). Ces deux points sur chaque pôles correspondent à l'association de CEP97 avec les centrioles dupliqués [268]. Dans les cellules ciliées RPE1, Aurora A et CEP97 sont localisées à la base des cils primaires marqués par la tubuline acétylée et forment entre deux et quatre structures ponctuelles bien que leur colocalisation soit partielle (Figure 40).

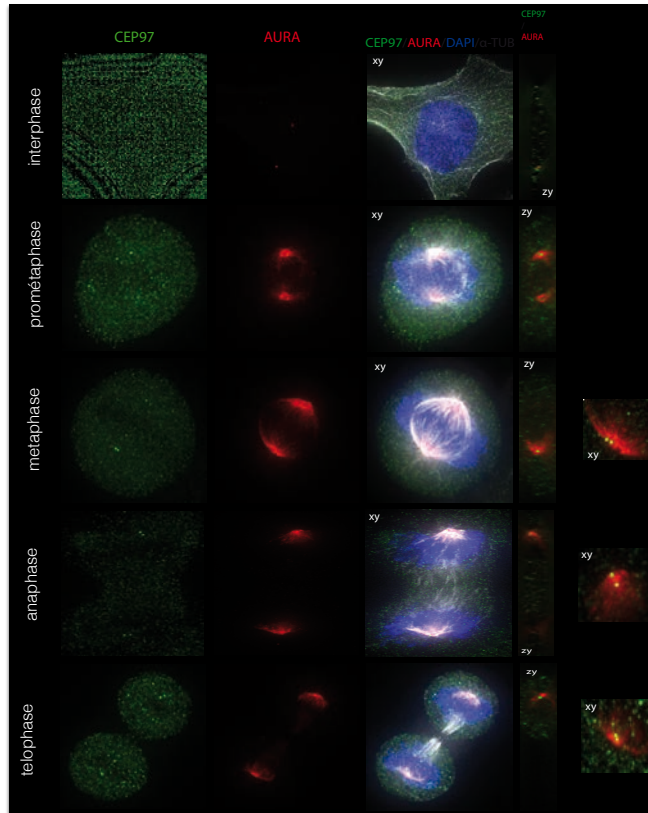


Figure 39 : Aurora A et CEP97 colocalisent au niveau des pôles en mitose

Images de cellules U2OS fixées et immunomarquées montrant la localisation de CEP97 et Aurora A en interphase et en mitose. Les images sont une projection maximum du plan z, CEP97 est en vert, Aurora A en rouge, l' α -tubuline en blanc et l'ADN en bleu. Les petites images xy sont des agrandissement des pôles et les images zy sont des projections d'un plan y sur les plans z. En mitose, CEP97 forme deux points à chaque pôle et colocalise avec Aurora A.

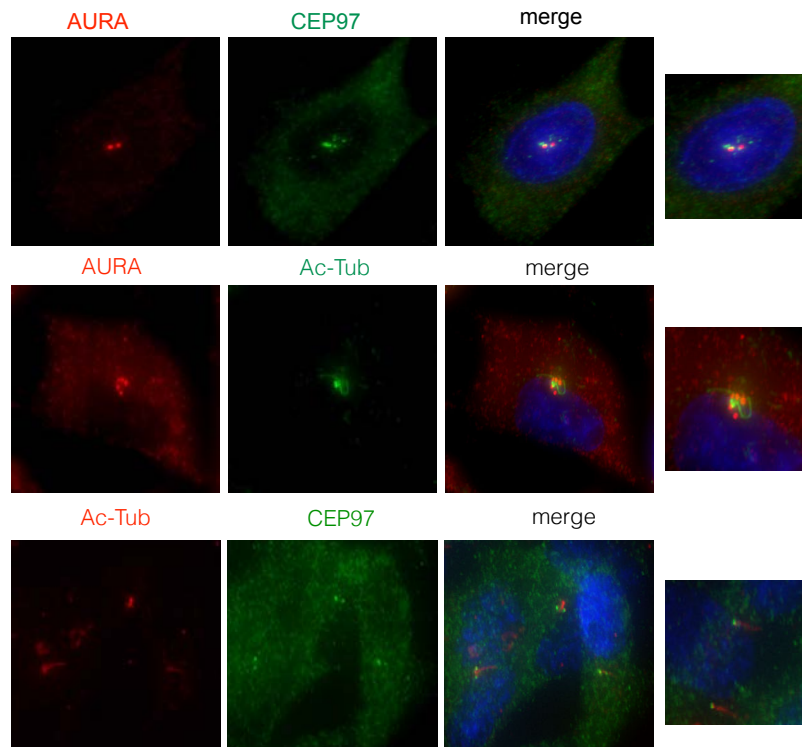


Figure 40 : Aurora A et CEP97 localisent au niveau de la base des cils primaires
 Images de cellules RPE1 fixées et immunomarquées montrant la localisation de CEP97, Aurora A et la tubuline acétylée en interphase. Les images sont une projection maximum du plan z, Les petites images sur la droite sont des agrandissement des pôles. Aurora A et CEP97 colocalisent partiellement au niveau de la base des cils primaires.

4.4. L'inhibition d'Aurora A entraîne la délocalisation de CEP97

L'analyse des images d'immunofluorescence des cellules U2OS traitées avec l'inhibiteur d'Aurora A montre que la localisation de CEP97 aux pôles est perturbée. Les deux points de CEP97 ne sont plus visibles au niveau des pôles, mais le marquage du cytoplasme est plus intense témoignant de la présence de CEP97 dans le cytoplasme. (Figure 41 - A). En détectant automatiquement les zones de maximum d'intensité, on peut mettre en évidence les structures ponctuelles de CEP97. La quantification de ces structures dans les cellules contrôles montrent qu'au moins deux points sont trouvés par cellules. (Figure 41 - B). Lorsqu'on traite les cellules avec un inhibiteur d'Aurora A pendant 24h, le nombre de structures ponctuelles de CEP97 chute à 1 pour 42% des cellules contre 8% dans les cellules contrôles. La valeur p du test exact de Fisher étant inférieure à 5%, ce phénotype de perte de localisation de CEP97 peut être relié à l'inhibition d'Aurora A.

4.5. Aurora A phosphoryle CEP97 *in vitro*

La perte de localisation de CEP97 *via* l'inhibition d'Aurora A nous amène à penser que CEP97 pourrait être un substrat d'Aurora A. J'ai réalisé des tests kinases *in vitro* avec

la protéine CEP97 recombinante. L'autoradiographie montre qu'elle est phosphorylée par Aurora A *in vitro* (Figure 41 - C).

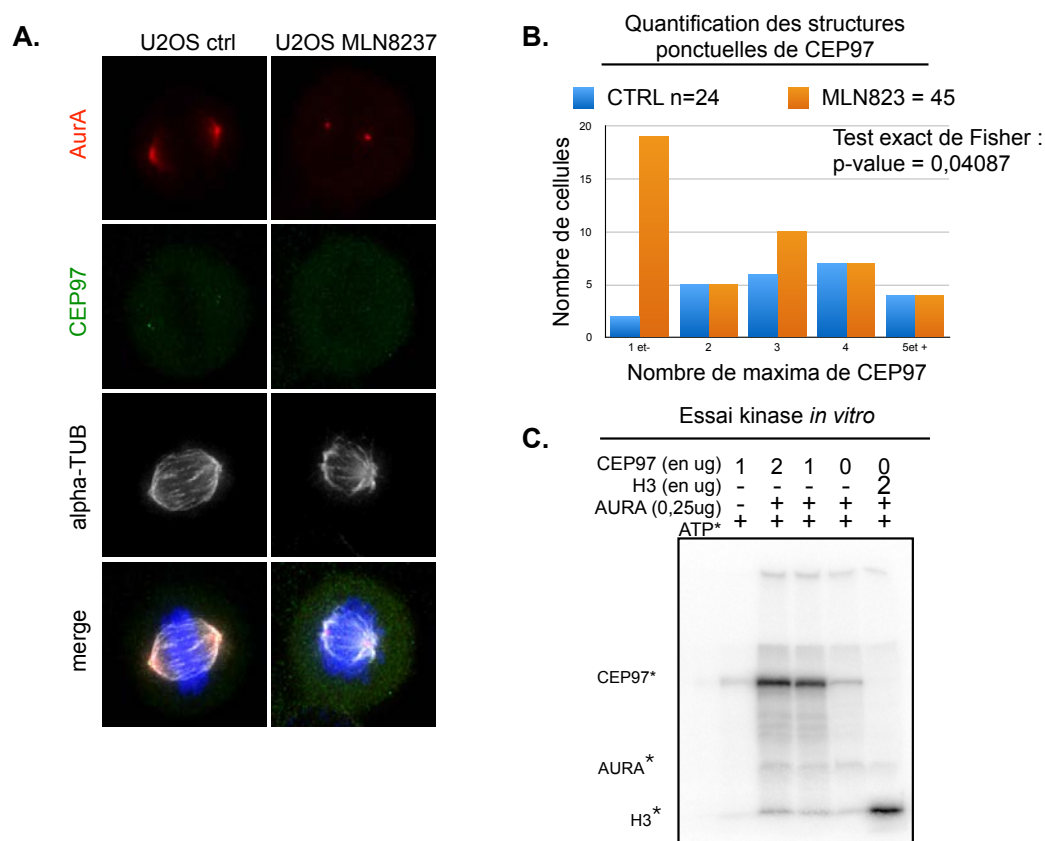


Figure 41 : L'inhibition d'Aurora A perturbe la localisation de CEP97

A- projection maximum d'images de microscopie de cellules U2OS fixées, immunomarquées : CEP97 en vert, Aurora A en rouge, l' α -tubuline en blanc et l'ADN en bleu. L'inhibition d'Aurora A par le MLN8237 perturbe la localisation de CEP97 au niveau des pôles. B - Histogramme présentant les résultats de l'analyse du nombre de zones maximum d'intensité de CEP97 dans les images d'immunofluorescence. L'inhibition d'Aurora A entraîne une perte significative du nombre de structure ponctuelle de CEP97. C - Autoradiographie montrant la phosphorylation *in vitro* de CEP97.

4.6. Discussion CEP97

Les données de l'interactome indiquent que CEP97 est un partenaire fort d'Aurora A. L'analyse des localisations de CEP97 montre qu'elle forme des structures ponctuelles associées aux centrioles [268]. Ainsi ces structures colocalisent avec Aurora A en mitose qui est fortement exprimée et concentrée aux centrosomes. En interphase, le niveau d'Aurora A aux centrosomes baisse et la localisation avec CEP97 n'est plus que partielle. Ces observations montrent que CEP97 entre en interaction avec Aurora A lors de mitose. Ainsi l'inhibition de l'activité kinase d'Aurora A perturbe la localisation de CEP97 qui forme moins de structures ponctuelles. En effet, CEP97 est un substrat *in vivo* d'Aurora A aussi sa phosphorylation par Aurora A pourrait directement

influencer sa localisation. Spektor et al ont montré que CEP97 interagissait fortement avec la CP110 mais qu'elle ne conditionnait pas sa localisation au centrosome. CP110 ne fait pas partie de notre liste de partenaires potentiels ainsi son interaction avec Aurora A serait liée à une fonction différente de celle décrite avec CP110. Aurora A pourrait également moduler la liaison de CEP97 avec CP110 *via* sa phosphorylation. Malgré des phénotypes de défauts mitotique décrits pour la déplétion de CEP97, je n'ai pas été capable d'observer ces défauts lors de la déplétion de CEP97 avec des siARN. En effet, l'utilisation de siARN montre par western-blot une déplétion correcte de la protéine mais les structures ponctuelles étaient toujours visibles en microscopie et aucun phénotype de défaut mitotique n'était observable (données non montrées). L'expression de forme étiquetées avec des protéines fluorescentes (GFP et mCherry) en N ou C terminale de CEP97, ne permet pas de faire des observations correctes. Ces protéines restent localisées dans le cytoplasme et ne présentent pas la structure ponctuelle aux centrosomes caractéristique de CEP97 endogène. Aussi les observations faites des cellules mitotiques doivent être confirmées notamment avec d'autres anticorps. Nous avons également observé la localisation d'Aurora A et CEP97 dans les cellules ciliées. Dans ces cellules la colocalisation entre CEP97 et Aurora A n'est que partielle. Elles présentent toutes des fonctions dans la régulation du cil et leur interaction pourrait être dans ces fonctions. Aussi l'inhibition d'Aurora A dans les cellules ciliées semble également perturbée la localisation de CEP97 (données non montrées - Christophe Tiffoche) mais ces observations doivent être répétées et confirmées avec d'autres anticorps.

Discussion

Les récentes améliorations des spectromètres de masse, le développement et l'optimisation des procédures d'isolement et d'analyse des complexes protéine-protéine ont conduit à une rapide expansion des listes d'interactions protéine-protéine. Ces listes sont pour la plupart disponibles dans la littérature et sur les bases de données, mais sont bien souvent données avec trop peu, voir pas, de description du contexte biologique dans lequel elles ont été identifiées. Or le contexte biologique conditionne l'intérêt d'un interactome qui n'est que le reflet d'une fraction des interactions moléculaires conduites au sein des cellules en réponse aux signaux intra et extracellulaires. Comme on peut le voir pour la kinase Aurora A, une simple dérégulation de son niveau d'expression peut entraîner d'importants changements au sein d'une cellule, qui peuvent aller jusqu'à entraîner sa mort. En effet, avec une poignée d'autres kinases, Aurora A orchestre presque chaque aspect de la mitose dans différents compartiments de la cellule *via* les multiples partenaires avec lesquels elle est en interaction. Ces partenaires régulent l'activité de la kinase à tous les niveaux : ils sont des activateurs ou des inhibiteurs de son activité, ils la stabilisent ou déstabilisent conduisant à sa dégradation ou changeant sa localisation et peuvent être substrats, conduisant le signal d'Aurora A dans différents processus moléculaires. Ses fonctions mitotiques et les mécanismes utilisés dans ces fonctions sont maintenant bien connus cependant un nombre croissant d'études montrent qu'Aurora A agit sur d'autres processus cellulaires. En effet, ses seules fonctions mitotiques ne permettent pas de comprendre tous les phénotypes liés à sa dérégulation. Afin d'identifier de nouveaux processus, j'ai analysé les partenaires d'Aurora A dans des conditions bien définies, reproductibles et contrôlées.

Pour ce faire, j'ai utilisé la purification par affinité d'une Aurora A-GFP exprimée à la place de l'endogène. Bien que les conditions de remplacement de l'endogène peuvent perturber les interactions normales d'Aurora A, le contrôle du niveau d'expression de cette kinase étiquetée et de la kinase endogène permet de tendre au maximum vers les conditions physiologiques. L'efficacité du remplacement de la kinase endogène a été contrôlée en profondeur *via* des tests de son activité *in vitro* [166], *via* le contrôle de son expression et de sa phosphorylation et par l'analyse du cycle cellulaire et de la mitose. Une fois validée, l'utilisation de ce modèle cellulaire offre de nombreux avantages par rapport à la simple purification de la protéine endogène. Ainsi, lors de la purification des complexes protéiques *via* le *tag* GFP, tous les épitopes d'Aurora A sont disponibles pour ses partenaires. Cette purification n'est pas dépendante des

modifications post-traductionnelles d'Aurora A qui sont des médiateurs importants dans ces interactions. Enfin, les anticorps disponibles pour le *tag* GFP sont très spécifiques et les expériences contrôles sont robustes et faciles à mettre en place. En effet, dans une expérience de purification par affinité d'une protéine endogène le contrôle le plus représentatif consiste à dépléter la protéine endogène [223]. Aurora A étant une protéine cruciale pour la cellule sa déplétion totale est difficilement possible et entraîne de graves défauts cellulaires perturbant toutes les interactions en cours dans la cellule.

En combinant la purification de la GFP-Aurora A à la spectrométrie de masse, nous avons identifié 477 partenaires potentiels. Parmi ces partenaires potentiels on retrouve 13 partenaires connus d'Aurora A (Annexe 1) et 24 protéines essentielles au cycle cellulaire (Annexe 2). La présence d'un quart des partenaires connus est un bon ratio qui permet de valider notre approche. De plus, on retrouve principalement des partenaires activateurs d'Aurora A, responsables de son activation et/ou sa localisation comme CEP92, NMP, TPX2 et SPAG5. Pour soutenir l'activation d'Aurora A au cours du temps, ils doivent être en interaction forte avec elle. Ainsi on peut s'attendre à trouver d'autres partenaires potentiels ayant une interaction forte avec Aurora A comme cela a été décrit pour WDR62 [265]. D'autres partenaires bien connus d'Aurora A sont absents de notre liste comme la kinase PLK1, TACC3 et CDC25. Ces partenaires sont des substrats d'Aurora A et par définition la phosphorylation est une modification dynamique, aussi les interactions en lien avec son activité kinase sont très rapides [271] et difficiles à identifier par AP-MS. Pour l'identification spécifique des substrats d'une kinase, la phosphoprotéomique quantitative utilisant la méthode SILAC est une technique plus adaptée [237]. Cependant l'utilisation d'inhibiteurs chimiques plus ou moins spécifiques d'Aurora A peut donner un nombre important de faux positifs. Dans la technique d'AP-MS, les faux positifs proviennent des réactions croisées de l'anticorps et des contaminants qui se lient à la matrice. Pour les discriminer, j'ai utilisé la méthode d'analyse statistique SAINT développée spécifiquement pour l'AP-MS [247]. Cette méthode convertit le compte spectral obtenu pour chaque proie en une donnée quantitative pour évaluer la probabilité d'être une vraie interaction. D'autres méthodes d'analyse existent, certaines méthodes basent leur calcul de probabilité à partir d'annotations externes, d'autres évaluent des probabilités de relation fonctionnelle, enfin l'algorithme utilisé varie beaucoup d'une méthode à l'autre. La méthode SAINT est une méthode non biaisée qui ne prend en compte que les données de l'expérience, qui est disponible en ligne et prend en compte les expériences contrôles. Bien qu'elle soit mieux adaptée pour de grands réseaux d'interactions comprenant plusieurs appâts, l'utilisation de l'ancienne version avec différentes options pour le calcul statistique

permet l'analyse de petits réseaux. Deux autres méthodes comparables à SAINT existent, la méthode ComPASS, disponible en ligne, qui comme SAINT calcule les probabilités à partir du compte spectral, mais ne prend pas en compte les expériences contrôles et decontaminator qui base son calcul sur les scores MASCOT [272]. Une comparaison des trois méthodes pourrait permettre d'affiner la classification des partenaires, mais la mise en place de critères de comparaison et leurs évaluations sont difficiles et requièrent de bonnes connaissances des modèles statistiques.

À partir des probabilités calculées avec SAINT, j'ai isolé un sous-réseau de 180 partenaires présentant une forte probabilité d'être une vraie interaction. Cet échantillonnage permet de faciliter les analyses de réseaux en diminuant le volume d'information et limitant le bruit lié aux contaminants. Ainsi, en utilisant différentes approches et applications disponibles sur cytoscape [248] j'ai mis en évidence deux nouvelles fonctions d'Aurora A.

La première est liée aux mitochondries. Il est déjà connu qu'Aurora A régule la fission des mitochondries en mitose *via* la régulation de RALA et RALBP1 [171]. Cependant la présence de plusieurs partenaires localisés à la mitochondrie suggère un rôle plus direct d'Aurora A. L'étude de cette nouvelle fonction fait l'objet d'une collaboration avec le Dr Guilia Bertolin. Les recherches sont bien avancées et montrent qu'Aurora A localise bien à la mitochondrie et régule différents processus.

La deuxième fonction nouvelle mise évidence par l'étude de l'interactome est la régulation des ARNm. Cette nouvelle fonction est supportée par les résultats de Moore et al. qui montrent le lien entre l'épissage alternatif des ARNm de facteurs apoptotiques avec le cycle cellulaire [174]. Ils montrent qu'Aurora A est un régulateur majeur de ce processus sans décrire le mécanisme par lequel Aurora A agit. Ainsi, la mise en évidence de plusieurs partenaires potentiels d'Aurora A impliqués dans ces mécanismes constitue une bonne base d'analyse. Ce projet sera développé au sein de notre équipe en collaboration avec l'équipe de Juan Valcarcel. Cette équipe a développé une technique automatisée de criblage par siARN des régulateurs de l'épissage alternatif qui leur permet de construire un réseau fonctionnel entre plus de 150 régulateurs [273]. L'idée est de comparer les événements d'épissage alternatifs observés avec et sans Aurora A et de faire lien avec 150 régulateurs possible en commençant par les partenaires potentiels mis en évidence dans mon interactome.

La mise en évidence de ces deux nouvelles fonctions repose sur l'analyse des 180 partenaires de forte probabilité. Parmi les 297 restants, il y a de fortes chances de trouver d'autres partenaires d'Aurora A en lien avec de nouvelles fonctions. Pour cela il faudrait étendre les analyses tout en limitant la proportion des contaminants. Aussi cet interactome constitue une base pour une meilleure compréhension des phénotypes

observés lors de la dérégulation d'Aurora A. La modélisation d'un interactome permet la représentation graphique d'un ensemble d'interactions moléculaires en réseau dans un modèle biologique donné dans des conditions définies. Ainsi, en plus de mettre en évidence de nouveaux processus biologiques impliquant Aurora A, la modélisation de son interactome permet déterminés les complexes protéiques et les cascades de signalisation dans lesquels elle intervient. Un interactome constitue donc un outil permettant de faire des prédictions notamment sur les éventuelles conséquences de sa surexpression ou de son inhibition notamment en cas de cancer (Figure 42).

Pour compléter les techniques de spectrométrie de masse, il existe d'autres techniques permettant de construire et valider un interactome. Ainsi, il serait possible de faire un crible utilisant des sh-ARN dirigés contre les partenaires identifiés couplés à une analyse en imagerie pour déterminer l'effet de la déplétion d'un partenaire donné sur la localisation d'Aurora A, son activité et les conséquences sur la mitose ou d'autres processus cellulaires. Pour discriminer les substrats des autres partenaires, il est également possible de tester *in vitro* la phosphorylation par Aurora A des partenaires et ainsi déterminer les cibles éventuelles lors de l'utilisation d'inhibiteurs chimiques dans le traitement du cancer.

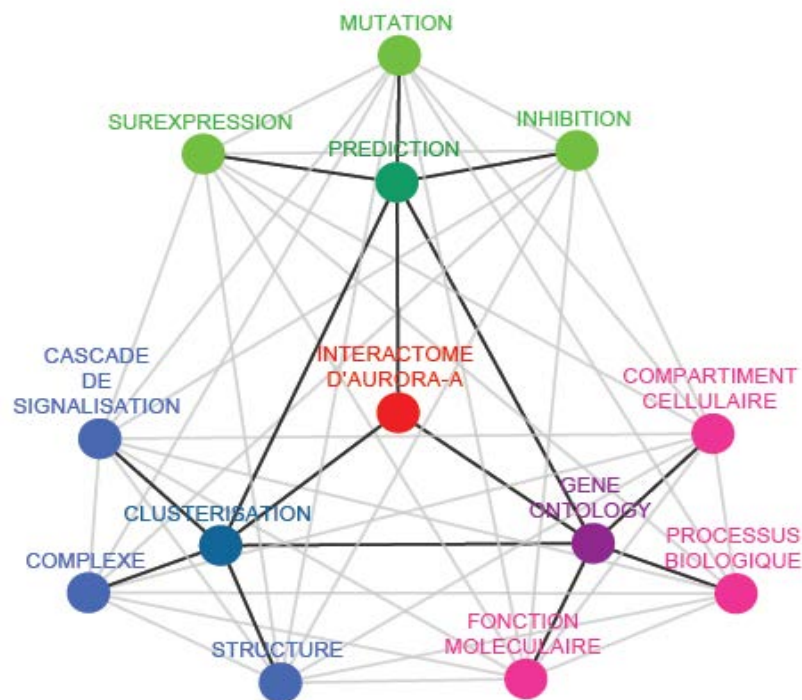


Figure 42 : L'interactome est un outil de prédiction

Représentation schématique de l'utilisation des informations découlant de l'analyse d'un interactome et de leurs connections.

Annexe 1

Partenaires connus d'Aurora A

Nom dans le texte	Nom de la protéine	Nom de Gene	Numéro d'entrée
controle de l'entrée en mitose			
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	P06493
Bora	Protein aurora borealis	BORA	Q6PGQ7
PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1	PLK1	P53350
CDC25B	M-phase inducer phosphatase 2	CDC25B	P30305
NPM1	Nucleophosmin	NPM1	P06748
PP1A	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	PPP1CA	P62136
PP1B	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PPP1CB	P62140
PP1G	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC	P36873
PP1R2	Protein phosphatase inhibitor 2	PPP1R2	P41236
PAK1	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	PAK1	Q13153
Arpc1b	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B	ARPC1B	O15143
PUM2	Pumilio homolog 2	PUM2	Q8TB72
maturation et disjonction des centrosomes			
CEP192	Centrosomal protein of 192 kDa	CEP192	Q8TEP8
PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1	PLK1	P53350
MST2	Serine/threonine-protein kinase 3	STK3	Q13188
LATS2	Serine/threonine-protein kinase LATS2	LATS2	Q9NRM7
Ajuba	LIM domain-containing protein ajuba	AJUBA	Q96IF1
NDEL1	Nuclear distribution protein nudE-like 1	NDEL1	Q9GZM8
Ski	Ski oncogene	SKI	P12755
CENT-2	Centrin-2	CETN2	P41208
CENT-3	Centrin-3	CETN3	O15182
LIMK1	LIM domain kinase 1	LIMK1	P53667
cofiline	Cofilin-1	CFL1	P23528
cofiline	Cofilin-2	CFL2	Q9Y281
assemblage du fuseau mitotique			
ch-TOG	Cytoskeleton-associated protein 5	CKAP5	Q14008
MCAK	Kinesin-like protein KIF2C	KIF2C	Q99661

KIF2A	Kinesin-like protein KIF2A	KIF2A	O00139
DDA3	Proline/serine-rich coiled-coil protein 1	PSRC1	Q6PGN9
TACC3	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	TACC3	Q9Y6A5
SUMO1	Small ubiquitin-related modifier 1	SUMO1	P63165
TPX2	Targeting protein for Xklp2	TPX2	Q9ULW0
PP6C	Serine/threonine-protein phosphatase 6 catalytic subunit	PPP6C	O00743
EG5	Kinesin-like protein KIF11	KIF11	P52732
HURP	Disks large-associated protein 5	DLGAP5	Q15398
SAF-A	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNPU	Q00839
ASAP	Microtubule-associated protein 9	MAP9	Q49MG5
NEDD1	Protein NEDD1	NEDD1	Q8NHV4
Hice1	HAUS augmin-like complex subunit 8	HAUS8	Q9BT25
Astrin	Sperm-associated antigen 5	SPAG5	Q96R06
rassemblement et bi-orientation des chromosomes			
CENP-E	Centromere-associated protein E	CENPE	Q02224
CENP-A	Histone H3-like centromeric protein A	CENPA	P49450
PP1A	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	PPP1CA	P62136
PP1B	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PPP1CB	P62140
PP1G	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC	P36873
progression mitotique			
RASSF1A	Ras association domain-containing protein 1	RASSF1	Q9NS23
CDH1	Fizzy-related protein homolog	FZR1	Q9UM11
CHFR	E3 ubiquitin-protein ligase CHFR	CHFR	Q96EP1
PP2A	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform	PPP2CA	P67775
PP2A	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	PPP2CB	P62714
fuseau central			
TACC3	Transforming acidic coiled-coil-containing protein 3	TACC3	Q9Y6A5
P150Glued	Dynactin subunit 1	DCTN1	Q14203
cytodiérèse			
CRMP-1	Dihydropyrimidinase-related protein 1	CRMP1	Q14194
GEF-H1	Rho guanine nucleotide exchange factor 2	ARHGEF2	Q92974
mitochondries			

RALA	Ras-related protein Ral-A	RALA	P11233
désassemblage du cils			
HEF1	Enhancer of filamentation 1	NEDD9	Q14511
HDAC6	Histone deacetylase 6	HDAC6	Q9UBN7
migration cellulaire			
src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	SRC	P12931
FAK	Focal adhesion kinase 1	PTK2	Q05397
phospholipase D2	Phospholipase D2	PLD2	O14939

Annexe 2

Protéines du cycle cellulaire

Nom dans le texte	Nom de la protéine	Nom de Gene	Numéro d'entrée
C-Nap1	Centrosome-associated protein CEP250	CEP250	Q9BV73
rootletin	Rootletin	CROCC	Q5TZA2
CEP68	Centrosomal protein of 68 kDa	CEP68	Q76N32
LRRC45	Leucine-rich repeat-containing protein 45	LRRC45	Q96CN5
β-catenin	Catenin beta-1	CTNNB1	P35222
PLK4	Serine/threonine-protein kinase PLK4	PLK4	O00444
SASS6	Spindle assembly abnormal protein 6 homolog	SASS6	Q6UVJ0
STIL	SCL-interrupting locus protein	STIL	Q15468
CEP135	Centrosomal protein of 135 kDa	CEP135	Q66GS9
CPAP	Centromere protein J	CENPJ	Q9HC77
centrobin	Centrobin	CNTROB	Q8N137
CEP120	Centrosomal protein of 120 kDa	CEP120	Q8N960
SPICE1	Spindle and centriole-associated protein 1	SPICE1	Q8N0Z3
CEP110	Centriolar coiled-coil protein of 110 kDa	CCP110	O43303
CEP97	Centrosomal protein of 97 kDa	CEP97	Q8IW35
hPOC5	Centrosomal protein POC5	POC5	Q8NA72
PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1	PLK1	P53350
Aurora A	Aurora kinase A	AURKA	O14965
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	P06493
Nek2A	Serine/threonine-protein kinase Nek2	NEK2	P51955
péricentrine	Pericentrin	PCNT	O95613
CEP152	Centrosomal protein of 152 kDa	CEP152	O94986
CEP215	CDK5 regulatory subunit-associated protein 2	CDK5RAP2	Q96SN8
CEP192	Centrosomal protein of 192 kDa	CEP192	Q8TEP8
ch-TOG	Cytoskeleton-associated protein 5	CKAP5	Q14008
MCAK	Kinesin-like protein KIF2C	KIF2C	Q99661
Ran	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	P62826
RanGAP	Ran GTPase-activating protein 1	RANGAP1	P46060
RCC1	Regulator of chromosome condensation	RCC1	P18754

TPX2	Targeting protein for Xklp2	TPX2	Q9ULW0
HURP	Disks large-associated protein 5	DLGAP5	Q15398
NuMA	Nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1	Q14980
EG5	Kinesin-like protein KIF11	KIF11	P52732
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	PRC1	O43663
KIF23	Kinesin-like protein KIF23	KIF23	Q02241
RACGAP1	Rac GTPase-activating protein 1	RACGAP1	Q9H0H5
RhoA	Transforming protein RhoA	RHOA	P61586
ECT2	Protein ECT2	ECT2	Q9H8V3
Cdk2	Cyclin-dependent kinase 2	CDK2	P24941
Cdk4	Cyclin-dependent kinase 4	CDK4	P11802
Cdk6	Cyclin-dependent kinase 6	CDK6	Q00534
Rb	Retinoblastoma-associated protein	RB1	P06400
E2F	Transcription factor E2F1	E2F1	Q01094
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	P06493
CDC20	Cell division cycle protein 20 homolog	CDC20	Q12834
UBE2C	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C	UBE2C	O00762
UBE2S	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 S	UBE2S	Q16763
CDH1	Fizzy-related protein homolog	FZR1	Q9UM11
séparase	Separin	ESPL1	Q14674
PP1A	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit	PPP1CA	P62136
PP1B	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PPP1CB	P62140
PP1G	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-gamma catalytic subunit	PPP1CC	P36873
PP2A	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta isoform	PPP2CB	P62714
PP4	Serine/threonine-protein phosphatase 4 catalytic subunit	PPP4C	P60510
PP5	Serine/threonine-protein phosphatase 5	PPP5C	P53041
PP7	Serine/threonine-protein phosphatase with EF-hands 1	PPEF1	O14829
Wee1	Wee1-like protein kinase	WEE1	P30291
Myt1	Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific cdc2-inhibitory kinase	PKMYT1	Q99640
CENP-E	Centromere-associated protein E	CENPE	Q02224
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	P78527
Aurora C	Aurora kinase C	AURKC	Q9UQB9

INCENP	Inner centromere protein	INCENP	Q9NQS7
Aurora B	Aurora kinase B	AURKB	Q96GD4
Survivin	Baculoviral IAP repeat-containing protein 5	BIRC5	O15392
borealin	Borealin	CDCA8	Q53HL2
Mad1	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD1	MAD1L1	Q9Y6D9
Mad2	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2A	MAD2L1	Q13257
Mad2	Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2B	MAD2L2	Q9UI95
Bub1	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1	BUB1	O43683
BubR1	Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta	BUB1B	O60566
Mps1	Dual specificity protein kinase TTK	TTK	P33981
KIF4	Chromosome-associated kinesin KIF4A	KIF4A	O95239
KIF4	Chromosome-associated kinesin KIF4B	KIF4B	Q2VIQ3
septin1	Septin-1	SEPT1	Q8WYJ6
Keratine 8	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	P05787
keratine 18	Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	P05783
GIT1	ARF GTPase-activating protein GIT1	GIT1	Q9Y2X7
PIX	Rho guanine nucleotide exchange factor 6	ARHGEF6	Q15052
PIX	Rho guanine nucleotide exchange factor 7	ARHGEF7	Q14155
SKAP	Small kinetochore-associated protein	KNSTRN	Q9Y448
CLASP1 α	CLIP-associating protein 1	CLASP1	Q7Z460
LC8	Dynein light chain 1, cytoplasmic	DYNLL1	P63167
LC8	Dynein light chain 2, cytoplasmic	DYNLL2	Q96FJ2

Bibliographie

1. Wolpert, L., The evolution of 'the cell theory'. *Curr Biol*, 1996. **6**(3): p. 225-8.
2. Mazzeo, P., A unifying concept: the history of cell theory. *Nat Cell Biol*, 1999. **1**(1): p. E13-5.
3. Reynolds, A., *The redoubtable cell*. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci*, 2010. **41**(3): p. 194-201.
4. Tixier-Vidal, A., [From the cell theory to the neuron theory]. *Biol Aujourd'hui*, 2010. **204**(4): p. 253-66.
5. O'Connor, C.M. and J.U. Adam, *Essentials of Cell Biology*. 2010: NPG Education.
6. Morgan, D.O., *Cell Cycle : Principles of Control*. *Primers in Biology* ed. 2007: New Science Press Ltd.
7. Baserga, R., Biochemistry of the cell cycle: a review. *Cell Tissue Kinet.*, 1968. **1**: p. 167-191.
8. Wang, G., Q. Jiang, and C. Zhang, The role of mitotic kinases in coupling the centrosome cycle with the assembly of the mitotic spindle. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 19): p. 4111-22.
9. Nigg, E.A., Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(5): p. 215-21.
10. Bettencourt-Dias, M. and Z. Carvalho-Santos, Double life of centrioles: CP110 in the spotlight. *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(1): p. 8-11.
11. Firat-Karalar, E.N. and T. Stearns, *The centriole duplication cycle*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2014. **369**(1650): p. 1-10.
12. Mennella, V., et al., Amorphous no more: subdiffraction view of the pericentriolar material architecture. *Trends Cell Biol*, 2014. **24**(3): p. 188-97.
13. Reber, S. and A.A. Hyman, Emergent Properties of the Metaphase Spindle. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2015. **7**(7): p. a015784.
14. Glotzer, M., The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009. **10**(1): p. 9-20.
15. Barr, F.A. and U. Gruneberg, Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell*, 2007. **131**(5): p. 847-60.
16. Ke, Y.N. and W.X. Yang, Primary cilium: an elaborate structure that blocks cell division? *Gene*, 2014. **547**(2): p. 175-85.
17. Chial, H., Genetic regulation of Cancer. *Nature Education*, 2008. **1**: p. 1-5.
18. Chial, H., Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education*, 2008. **1**: p. 1-6.

19. Peters, J.M., The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. **7**(9): p. 644-56.
20. Sullivan, M. and D.O. Morgan, Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(11): p. 894-903.
21. Sivakumar, S. and G.J. Gorbsky, Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015. **16**(2): p. 82-94.
22. Hunt, T., Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr Opin Cell Biol*, 1989. **1**(2): p. 268-74.
23. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Mammalian cyclin-dependent kinases*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(11): p. 630-41.
24. Morgan, D.O., Principles of CDK regulation. *Nature*, 1995. **374**(6518): p. 131-4.
25. Pavletich, N.P., Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdk, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol*, 1999. **287**(5): p. 821-8.
26. Malumbres, M. and M. Barbacid, Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*, 2009. **9**(3): p. 153-66.
27. Asghar, U., et al., The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2015. **14**(2): p. 130-46.
28. Bollen, M., D.W. Gerlich, and B. Lesage, Mitotic phosphatases: from entry guards to exit guides. *Trends Cell Biol*, 2009. **19**(10): p. 531-41.
29. Wurzenberger, C. and D.W. Gerlich, Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(8): p. 469-82.
30. Johnson, E.S. and S. Kornbluth, Phosphatases driving mitosis: pushing the gas and lifting the brakes. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012. **106**: p. 327-41.
31. Qian, J., C. Winkler, and M. Bollen, *4D-networking by mitotic phosphatases*. *Curr Opin Cell Biol*, 2013. **25**(6): p. 697-703.
32. Sadhu, K., et al., Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(13): p. 5139-43.
33. Nagata, A., et al., An additional homolog of the fission yeast cdc25+ gene occurs in humans and is highly expressed in some cancer cells. *New Biol*, 1991. **3**(10): p. 959-68.
34. Boutros, R., V. Lobjois, and B. Ducommun, CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer*, 2007. **7**(7): p. 495-507.
35. Lindqvist, A., et al., Cdc25B cooperates with Cdc25A to induce mitosis but has a unique role in activating cyclin B1-Cdk1 at the centrosome. *J Cell Biol*, 2005. **171**(1): p. 35-45.
36. Boutros, R., C. Dozier, and B. Ducommun, *The when and wheres of CDC25*

phosphatases. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(2): p. 185-91.

37. Kurimchak, A. and X. Grana, PP2A holoenzymes negatively and positively regulate cell cycle progression by dephosphorylating pocket proteins and multiple CDK substrates. *Gene*, 2012. **499**(1): p. 1-7.

38. Trinkle-Mulcahy, L. and A.I. Lamond, Mitotic phosphatases: no longer silent partners. *Curr Opin Cell Biol*, 2006. **18**(6): p. 623-31.

39. Zeng, K., et al., Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J Cell Biol*, 2010. **191**(7): p. 1315-32.

40. Hammond, D., et al., Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause chromosome instability and DNA damage owing to dysregulated Aurora-A. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 15): p. 3429-40.

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

42. Zitouni, S., et al., Polo-like kinases: structural variations lead to multiple functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(7): p. 433-52.

43. Morris, N.R., Mitotic mutants of *Aspergillus nidulans*. *Genet Res*, 1975. **26**(3): p. 237-54.

44. Fry, A.M., et al., Cell cycle regulation by the NEK family of protein kinases. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 19): p. 4423-33.

45. Meirelles, G.V., et al., "Stop Ne(c)king around": How interactomics contributes to functionally characterize Nek family kinases. *World J Biol Chem*, 2014. **5**(2): p. 141-60.

46. O'Regan, L., J. Blot, and A.M. Fry, Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div*, 2007. **2**: p. 25-37.

47. Chan, C.S. and D. Botstein, Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics*, 1993. **135**(3): p. 677-91.

48. Vader, G. and S.M. Lens, The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1786**(1): p. 60-72.

49. Glover, D.M., et al., Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, 1995. **81**(1): p. 95-105.

50. Roghi, C., et al., The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci*, 1998. **111 (Pt 5)**: p. 557-72.

51. Carmena, M. and W.C. Earnshaw, The cellular geography of aurora kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(11): p. 842-54.

52. Kollareddy, M., et al., Aurora kinases: structure, functions and their association with cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2008.

152(1): p. 27-33.

53. Goldenson, B. and J.D. Crispino, The aurora kinases in cell cycle and leukemia. *Oncogene*, 2015. **34**(5): p. 537-45.

54. Eyers, P.A., M.E. Churchill, and J.L. Maller, The Aurora A and Aurora B protein kinases: a single amino acid difference controls intrinsic activity and activation by TPX2. *Cell Cycle*, 2005. **4**(6): p. 784-9.

55. Fu, J., et al., A single amino acid change converts Aurora-A into Aurora-B-like kinase in terms of partner specificity and cellular function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(17): p. 6939-44.

56. Hans, F., et al., Molecular distinctions between Aurora A and B: a single residue change transforms Aurora A into correctly localized and functional Aurora B. *Mol Biol Cell*, 2009. **20**(15): p. 3491-502.

57. Littlepage, L.E., et al., Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15440-5.

58. Bayliss, R., et al., Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle. *Mol Cell*, 2003. **12**(4): p. 851-62.

59. Nowakowski, J., et al., Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. *Structure*, 2002. **10**(12): p. 1659-67.

60. Castro, A., et al., The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Rep*, 2002. **3**(12): p. 1209-14.

61. Littlepage, L.E. and J.V. Ruderman, Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. *Genes Dev*, 2002. **16**(17): p. 2274-85.

62. Nguyen, H.G., et al., Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(12): p. 4977-92.

63. Alexander, J., et al., Spatial exclusivity combined with positive and negative selection of phosphorylation motifs is the basis for context-dependent mitotic signaling. *Sci Signal*, 2011. **4**(179): p. ra42.

64. Marumoto, T., D. Zhang, and H. Saya, *Aurora-A - a guardian of poles*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(1): p. 42-50.

65. Hannak, E., et al., Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, 2001. **155**(7): p. 1109-16.

66. Pugacheva, E.N., et al., HEF1-dependent Aurora A activation induces

- disassembly of the primary cilium. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1351-63.
67. Mahankali, M., et al., A non-mitotic role for Aurora kinase A as a direct activator of cell migration upon interaction with PLD, FAK and Src. *J Cell Sci*, 2015. **128**(3): p. 516-26.
68. Ruchaud, S., M. Carmena, and W.C. Earnshaw, Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(10): p. 798-812.
69. Lampson, M.A. and I.M. Cheeseman, Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol*, 2011. **21**(3): p. 133-40.
70. Carmena, M., et al., The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. **13**(12): p. 789-803.
71. van der Waal, M.S., et al., Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Exp Cell Res*, 2012. **318**(12): p. 1407-20.
72. van der Horst, A. and S.M. Lens, Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma*, 2014. **123**(1-2): p. 25-42.
73. Kitagawa, M. and S.H. Lee, The chromosomal passenger complex (CPC) as a key orchestrator of orderly mitotic exit and cytokinesis. *Front Cell Dev Biol*, 2015. **3**: p. 14-28.
74. Bernard, M., et al., Cloning of STK13, a third human protein kinase related to *Drosophila aurora* and budding yeast *Ipl1* that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics*, 1998. **53**(3): p. 406-9.
75. Tseng, T.C., et al., Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA Cell Biol*, 1998. **17**(10): p. 823-33.
76. Kimura, M., et al., Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/*Ipl1*-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem*, 1999. **274**(11): p. 7334-40.
77. Dutertre, S., et al., The absence of p53 aggravates polyploidy and centrosome number abnormality induced by Aurora-C overexpression. *Cell Cycle*, 2005. **4**(12): p. 1783-7.
78. Sasai, K., et al., Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2004. **59**(4): p. 249-63.
79. Slattery, S.D., et al., Aurora-C kinase supports mitotic progression in the absence of Aurora-B. *Cell Cycle*, 2009. **8**(18): p. 2984-94.
80. Tsou, J.H., et al., Aberrantly expressed AURKC enhances the transformation and tumourigenicity of epithelial cells. *J Pathol*, 2011. **225**(2): p. 243-54.

81. Lin, B.W., et al., Overexpression of Aurora-C interferes with the spindle checkpoint by promoting the degradation of Aurora-B. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1106.
82. Balboula, A.Z. and K. Schindler, Selective disruption of aurora C kinase reveals distinct functions from aurora B kinase during meiosis in mouse oocytes. *PLoS Genet*, 2014. **10**(2): p. e1004194.
83. Dieterich, K., et al., Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. *Nat Genet*, 2007. **39**(5): p. 661-5.
84. Barr, A.R. and F. Gergely, Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 17): p. 2987-96.
85. Nikonova, A.S., et al., Aurora A kinase (AURKA) in normal and pathological cell division. *Cell Mol Life Sci*, 2012: p. 661-687.
86. Hutterer, A., et al., Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Dev Cell*, 2006. **11**(2): p. 147-57.
87. Macurek, L., et al., Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature*, 2008. **455**(7209): p. 119-23.
88. Seki, A., et al., Bora and the kinase Aurora a cooperatively activate the kinase Plk1 and control mitotic entry. *Science*, 2008. **320**(5883): p. 1655-8.
89. Bruinsma, W., et al., Bora and Aurora-A continue to activate Plk1 in mitosis. *J Cell Sci*, 2014. **127**(Pt 4): p. 801-11.
90. Cazales, M., et al., CDC25B phosphorylation by Aurora-A occurs at the G2/M transition and is inhibited by DNA damage. *Cell Cycle*, 2005. **4**(9): p. 1233-8.
91. Dutertre, S., et al., Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 12): p. 2523-31.
92. Okuda, M., The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene*, 2002. **21**(40): p. 6170-4.
93. Rebutier, D., et al., Nucleophosmin/B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J Cell Biol*, 2012. **197**(1): p. 19-26.
94. Shandilya, J., et al., Phosphorylation of multifunctional nucleolar protein nucleophosmin (NPM1) by aurora kinase B is critical for mitotic progression. *FEBS Lett*, 2014. **588**(14): p. 2198-205.
95. Eto, M., et al., Inhibitor-2 regulates protein phosphatase-1 complexed with NimA-related kinase to induce centrosome separation. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 44013-20.
96. Wang, W., P.T. Stukenberg, and D.L. Brautigan, Phosphatase inhibitor-2 balances protein phosphatase 1 and aurora B kinase for chromosome segregation and cytokinesis in human retinal epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(11): p. 4852-62.

97. Satinover, D.L., et al., Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(23): p. 8625-30.
98. Zhao, Z.S., et al., The GIT-associated kinase PAK targets to the centrosome and regulates Aurora-A. *Mol Cell*, 2005. **20**(2): p. 237-49.
99. Dummler, B., et al., Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2009. **28**(1-2): p. 51-63.
100. Molli, P.R., et al., Arpc1b, a centrosomal protein, is both an activator and substrate of Aurora A. *J Cell Biol*, 2010. **190**(1): p. 101-14.
101. Huang, Y.H., et al., A translational regulator, PUM2, promotes both protein stability and kinase activity of Aurora-A. *PLoS One*, 2011. **6**(5): p. e19718.
102. Gomez-Ferreria, M.A., et al., Human Cep192 is required for mitotic centrosome and spindle assembly. *Curr Biol*, 2007. **17**(22): p. 1960-6.
103. Joukov, V., et al., Centrosomal protein of 192 kDa (Cep192) promotes centrosome-driven spindle assembly by engaging in organelle-specific Aurora A activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(49): p. 21022-7.
104. Joukov, V., J.C. Walter, and A. De Nicolo, The Cep192-organized aurora A-Plk1 cascade is essential for centrosome cycle and bipolar spindle assembly. *Mol Cell*, 2014. **55**(4): p. 578-91.
105. Meng, L., et al., Bimodal Interaction of Mammalian Polo-Like Kinase 1 and a Centrosomal Scaffold, Cep192, in the Regulation of Bipolar Spindle Formation. *Mol Cell Biol*, 2015.
106. Toji, S., et al., The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells*, 2004. **9**(5): p. 383-97.
107. Abe, Y., et al., LATS2-Ajuba complex regulates gamma-tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. *FEBS Lett*, 2006. **580**(3): p. 782-8.
108. Emery, A., et al., A novel cell-based, high-content assay for phosphorylation of Lats2 by Aurora A. *J Biomol Screen*, 2011. **16**(8): p. 925-31.
109. Yabuta, N., et al., The tumor suppressor Lats2 is pivotal in Aurora A and Aurora B signaling during mitosis. *Cell Cycle*, 2011. **10**(16): p. 2724-36.
110. Hirota, T., et al., Aurora-A and an interacting activator, the LIM protein Ajuba, are required for mitotic commitment in human cells. *Cell*, 2003. **114**(5): p. 585-98.
111. Sabino, D., N.H. Brown, and R. Basto, *Drosophila* Ajuba is not an Aurora-A activator but is required to maintain Aurora-A at the centrosome. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 7): p. 1156-66.
112. Mori, D., et al., NDEL1 phosphorylation by Aurora-A kinase is essential for

centrosomal maturation, separation, and TACC3 recruitment. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(1): p. 352-67.

113. Mosquera, J., et al., Identification of Ski as a target for Aurora A kinase. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **409**(3): p. 539-43.

114. Rivas, S., et al., The Ski Protein is Involved in the Transformation Pathway of Aurora Kinase A. *J Cell Biochem*, 2015. **117**(2): p. 334-343.

115. Lukasiewicz, K.B., et al., Control of centrin stability by Aurora A. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21291.

116. Ritchey, L., et al., A functional cooperativity between Aurora A kinase and LIM kinase1: implication in the mitotic process. *Cell Cycle*, 2012. **11**(2): p. 296-309.

117. Ritchey, L. and R. Chakrabarti, Aurora A kinase modulates actin cytoskeleton through phosphorylation of Cofilin: Implication in the mitotic process. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1843**(11): p. 2719-29.

118. De Luca, M., et al., Aurora-A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. *Oncogene*, 2008. **27**(51): p. 6539-49.

119. Asteriti, I.A., et al., Aurora-A inactivation causes mitotic spindle pole fragmentation by unbalancing microtubule-generated forces. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 131-143.

120. Zhang, X., S.C. Ems-McClung, and C.E. Walczak, Aurora A phosphorylates MCAK to control ran-dependent spindle bipolarity. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(7): p. 2752-65.

121. Tanenbaum, M.E., et al., A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. *Curr Biol*, 2011. **21**(16): p. 1356-65.

122. Jang, C.Y., et al., Plk1 and Aurora A regulate the depolymerase activity and the cellular localization of Kif2a. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 9): p. 1334-41.

123. Jang, C.Y., et al., Mitotic kinases regulate MT-polymerizing/MT-bundling activity of DDA3. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **408**(1): p. 174-9.

124. Jang, C.Y. and G. Fang, DDA3 associates with MCAK and controls chromosome congression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **407**(3): p. 610-4.

125. Peset, I. and I. Vernos, The TACC proteins: TACC-ling microtubule dynamics and centrosome function. *Trends Cell Biol*, 2008. **18**(8): p. 379-88.

126. Ha, G.H., J.L. Kim, and E.K. Breuer, Transforming acidic coiled-coil proteins (TACCs) in human cancer. *Cancer Lett*, 2013. **336**(1): p. 24-33.

127. Fu, W., et al., Clathrin recruits phosphorylated TACC3 to spindle poles for bipolar spindle assembly and chromosome alignment. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 21): p. 3645-51.

128. Hood, F.E. and S.J. Royle, Pulling it together: The mitotic function of TACC3.

Bioarchitecture, 2011. **1**(3): p. 105-109.

129. Foraker, A.B., et al., Clathrin promotes centrosome integrity in early mitosis through stabilization of centrosomal ch-TOG. *J Cell Biol*, 2012. **198**(4): p. 591-605.

130. Lioutas, A. and I. Vernos, Aurora A kinase and its substrate TACC3 are required for central spindle assembly. *EMBO Rep*, 2013. **14**(9): p. 829-36.

131. Perez de Castro, I., et al., A SUMOylation Motif in Aurora-A: Implications for Spindle Dynamics and Oncogenesis. *Front Oncol*, 2011. **1**: p. 50-63.

132. Tsai, M.Y., et al., A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol*, 2003. **5**(3): p. 242-8.

133. Kufer, T.A., et al., Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J Cell Biol*, 2002. **158**(4): p. 617-23.

134. Eysers, P.A., et al., A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol*, 2003. **13**(8): p. 691-7.

135. Haydon, C.E., et al., Identification of novel phosphorylation sites on *Xenopus laevis* Aurora A and analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. *Mol Cell Proteomics*, 2003. **2**(10): p. 1055-67.

136. Eysers, P.A. and J.L. Maller, Regulation of *Xenopus* Aurora A activation by TPX2. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 9008-15.

137. Bird, A.W. and A.A. Hyman, Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *J Cell Biol*, 2008. **182**(2): p. 289-300.

138. Giubettini, M., et al., Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 1): p. 113-22.

139. Xu, X., et al., Two TPX2-dependent switches control the activity of Aurora A. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e16757.

140. Dodson, C.A. and R. Bayliss, Activation of Aurora-A kinase by protein partner binding and phosphorylation are independent and synergistic. *J Biol Chem*, 2012. **287**(2): p. 1150-7.

141. Neumayer, G., et al., TPX2: of spindle assembly, DNA damage response, and cancer. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(16): p. 3027-47.

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

143. Tanenbaum, M.E. and R.H. Medema, Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Dev Cell*, 2010. **19**(6): p. 797-806.

144. Ma, N., et al., Poleward transport of TPX2 in the mammalian mitotic spindle requires dynein, Eg5, and microtubule flux. *Mol Biol Cell*, 2010. **21**(6): p. 979-88.

145. Ma, N., et al., TPX2 regulates the localization and activity of Eg5 in the

- mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol*, 2011. **195**(1): p. 87-98.
146. Giet, R., et al., The *Xenopus laevis* aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XIEg5. *J Biol Chem*, 1999. **274**(21): p. 15005-13.
147. Asteriti, I.A., et al., Aurora-A inactivation causes mitotic spindle pole fragmentation by unbalancing microtubule-generated forces. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 131.
148. Ma, H.T., et al., Synergism between inhibitors of Aurora A and KIF11 overcomes KIF15-dependent drug resistance. *Mol Oncol*, 2014. **8**(8): p. 1404-18.
149. Yu, C.T., et al., Phosphorylation and stabilization of HURP by Aurora-A: implication of HURP as a transforming target of Aurora-A. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(14): p. 5789-800.
150. Wong, J., et al., Aurora A regulates the activity of HURP by controlling the accessibility of its microtubule-binding domain. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(5): p. 2083-91.
151. Wu, J.M., et al., Aurora kinase inhibitors reveal mechanisms of HURP in nucleation of centrosomal and kinetochore microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(19): p. E1779-87.
152. Ma, N., et al., The nuclear scaffold protein SAF-A is required for kinetochore-microtubule attachment and contributes to the targeting of Aurora-A to mitotic spindles. *J Cell Sci*, 2011. **124**(Pt 3): p. 394-404.
153. Saffin, J.M., et al., ASAP, a human microtubule-associated protein required for bipolar spindle assembly and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(32): p. 11302-7.
154. Venoux, M., et al., ASAP is a novel substrate of the oncogenic mitotic kinase Aurora-A: phosphorylation on Ser625 is essential to spindle formation and mitosis. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(2): p. 215-24.
155. Pinyol, R., J. Scrofani, and I. Vernos, The role of NEDD1 phosphorylation by Aurora A in chromosomal microtubule nucleation and spindle function. *Curr Biol*, 2013. **23**(2): p. 143-9.
156. Tsai, C.Y., et al., Aurora-A phosphorylates Augmin complex component Hice1 protein at an N-terminal serine/threonine cluster to modulate its microtubule binding activity during spindle assembly. *J Biol Chem*, 2011. **286**(34): p. 30097-106.
157. Du, J., et al., Astrin regulates Aurora-A localization. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008. **370**(2): p. 213-9.
158. Chiu, S.C., et al., The mitosis-regulating and protein-protein interaction activities of astrin are controlled by aurora-A-induced phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014. **307**(5): p. C466-78.

159. Kunitoku, N., et al., CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev Cell*, 2003. **5**(6): p. 853-64.
160. Kim, Y., et al., Aurora kinases and protein phosphatase 1 mediate chromosome congression through regulation of CENP-E. *Cell*, 2010. **142**(3): p. 444-55.
161. Song, M.S., et al., The tumour suppressor RASSF1A regulates mitosis by inhibiting the APC-Cdc20 complex. *Nat Cell Biol*, 2004. **6**(2): p. 129-37.
162. Rong, R., et al., Mitotic kinase Aurora-A phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. *Oncogene*, 2007. **26**(55): p. 7700-8.
163. Song, S.J., et al., Aurora A regulates prometaphase progression by inhibiting the ability of RASSF1A to suppress APC-Cdc20 activity. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2314-23.
164. Liu, L., et al., RASSF1A interacts with and activates the mitotic kinase Aurora-A. *Oncogene*, 2008. **27**(47): p. 6175-86.
165. Floyd, S., J. Pines, and C. Lindon, APC/C Cdh1 targets aurora kinase to control reorganization of the mitotic spindle at anaphase. *Curr Biol*, 2008. **18**(21): p. 1649-58.
166. Rebutier, D., et al., Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150Glued. *J Cell Biol*, 2013. **201**(1): p. 65-79.
167. Chen, T.C., et al., From midbody protein-protein interaction network construction to novel regulators in cytokinesis. *J Proteome Res*, 2009. **8**(11): p. 4943-53.
168. Birkenfeld, J., et al., GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Dev Cell*, 2007. **12**(5): p. 699-712.
169. Mishra, P. and D.C. Chan, Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(10): p. 634-46.
170. Kashatus, D.F. and C.M. Counter, Breaking up is hard to do: RalA, mitochondrial fission and cancer. *Small GTPases*, 2011. **2**(6): p. 329-333.
171. Kashatus, D.F., et al., RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. *Nat Cell Biol*, 2011. **13**(9): p. 1108-15.
172. Maia, A.R. and H. Maiato, Aurora Mitochondrialis drives fission during mitosis. *Dev Cell*, 2011. **21**(3): p. 387-8.
173. Lee, S., et al., Human mitochondrial Fis1 links to cell cycle regulators at G2/M transition. *Cell Mol Life Sci*, 2013. **71**(4): p. 711-725.
174. Moore, M.J., et al., An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell*, 2010. **142**(4): p. 625-36.
175. Rannou, Y., et al., Localization of aurora A and aurora B kinases during interphase: role of the N-terminal domain. *Cell Cycle*, 2008. **7**(19): p. 3012-20.

176. Pugacheva, E.N. and E.A. Golemis, The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat Cell Biol*, 2005. **7**(10): p. 937-46.
177. Pugacheva, E.N. and E.A. Golemis, HEF1-aurora A interactions: points of dialog between the cell cycle and cell attachment signaling networks. *Cell Cycle*, 2006. **5**(4): p. 384-91.
178. Plotnikova, O.V., et al., Rapid calcium-dependent activation of Aurora-A kinase. *Nat Commun*, 2010. **1**: p. 64-72.
179. Plotnikova, O.V., et al., Calmodulin activation of Aurora-A kinase (AURKA) is required during ciliary disassembly and in mitosis. *Mol Biol Cell*, 2012. **23**(14): p. 2658-70.
180. Kinzel, D., et al., Pitchfork regulates primary cilia disassembly and left-right asymmetry. *Dev Cell*, 2010. **19**(1): p. 66-77.
181. Lorenzo, C., et al., Pharmacological inhibition of aurora-A but not aurora-B impairs interphase microtubule dynamics. *Cell Cycle*, 2009. **8**(11): p. 1733-7.
182. Mori, D., et al., An essential role of the aPKC-Aurora A-NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(9): p. 1057-68.
183. Yamada, M., S. Hirotsune, and A. Wynshaw-Boris, The essential role of LIS1, NDEL1 and Aurora-A in polarity formation and microtubule organization during neurogenesis. *Cell Adh Migr*, 2010. **4**(2): p. 180-4.
184. Bischoff, J.R., et al., A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*, 1998. **17**(11): p. 3052-65.
185. Tatsuka, M., et al., Multinuclearity and increased ploidy caused by overexpression of the aurora- and lpl1-like midbody-associated protein mitotic kinase in human cancer cells. *Cancer Res*, 1998. **58**(21): p. 4811-6.
186. Zhou, H., et al., Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*, 1998. **20**(2): p. 189-93.
187. Kallioniemi, A., et al., Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(6): p. 2156-60.
188. Schlegel, J., et al., Comparative genomic in situ hybridization of colon carcinomas with replication error. *Cancer Res*, 1995. **55**(24): p. 6002-5.
189. Aguirre-Portoles, C., et al., Tpx2 controls spindle integrity, genome stability, and tumor development. *Cancer Res*, 2012. **72**(6): p. 1518-28.
190. Sanbhnani, S. and F.M. Yeong, CHFR: a key checkpoint component implicated in a wide range of cancers. *Cell Mol Life Sci*, 2012. **69**(10): p. 1669-87.

191. Li, C.C., et al., Aurora-A overexpression in mouse liver causes p53-dependent premitotic arrest during liver regeneration. *Mol Cancer Res*, 2009. **7**(5): p. 678-88.
192. Meraldi, P., R. Honda, and E.A. Nigg, Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J*, 2002. **21**(4): p. 483-92.
193. Wu, J.C., et al., Identification of V23RaiA-Ser194 as a critical mediator for Aurora-A-induced cellular motility and transformation by small pool expression screening. *J Biol Chem*, 2005. **280**(10): p. 9013-22.
194. Lim, K.H., et al., Aurora-A phosphorylates, activates, and relocalizes the small GTPase RaiA. *Mol Cell Biol*, 2010. **30**(2): p. 508-23.
195. Sumi, T., K. Matsumoto, and T. Nakamura, Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 670-6.
196. Johnson, E.O., et al., LIMK2 is a crucial regulator and effector of Aurora-A-kinase-mediated malignancy. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 5): p. 1204-16.
197. Katayama, H., et al., Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet*, 2004. **36**(1): p. 55-62.
198. Briassouli, P., et al., Aurora-A regulation of nuclear factor-kappaB signaling by phosphorylation of I kappa B alpha. *Cancer Res*, 2007. **67**(4): p. 1689-95.
199. Zou, L., et al., Aurora-A interacts with AP-2alpha and down regulates its transcription activity. *PLoS One*, 2011. **6**(8): p. e23110.
200. Katayama, H., et al., Aurora kinase-A inactivates DNA damage-induced apoptosis and spindle assembly checkpoint response functions of p73. *Cancer Cell*, 2012. **21**(2): p. 196-211.
201. Donehower, L.A., et al., Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability. *Genes Dev*, 1995. **9**(7): p. 882-95.
202. Fukasawa, K., et al., Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science*, 1996. **271**(5256): p. 1744-7.
203. Hu, W., et al., Frequent overexpression of STK15/Aurora-A/BTAK and chromosomal instability in tumorigenic cell cultures derived from human ovarian cancer. *Oncol Res*, 2005. **15**(1): p. 49-57.
204. Wang, Y., et al., Aurora-A: a potential DNA repair modulator. *Tumour Biol*, 2014. **35**(4): p. 2831-6.
205. Liu, Q., et al., Aurora-A abrogation of p53 DNA binding and transactivation activity by phosphorylation of serine 215. *J Biol Chem*, 2004. **279**(50): p. 52175-82.
206. Hsueh, K.W., et al., A novel Aurora-A-mediated phosphorylation of p53 inhibits its

- interaction with MDM2. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1834**(2): p. 508-15.
207. Yang, H., et al., Aurora-A induces cell survival and chemoresistance by activation of Akt through a p53-dependent manner in ovarian cancer cells. *Int J Cancer*, 2006. **119**(10): p. 2304-12.
208. Zhang, D., et al., Aurora A overexpression induces cellular senescence in mammary gland hyperplastic tumors developed in p53-deficient mice. *Oncogene*, 2008. **27**(31): p. 4305-14.
209. Chen, S.S., et al., Suppression of the STK15 oncogenic activity requires a transactivation-independent p53 function. *EMBO J*, 2002. **21**(17): p. 4491-9.
210. Shao, S., et al., Gadd45a interacts with aurora-A and inhibits its kinase activity. *J Biol Chem*, 2006. **281**(39): p. 28943-50.
211. Sanchez, R., et al., Solution structure of human growth arrest and DNA damage 45alpha (Gadd45alpha) and its interactions with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Aurora A kinase. *J Biol Chem*, 2010. **285**(29): p. 22196-201.
212. Neben, K., et al., Microarray-based screening for molecular markers in medulloblastoma revealed STK15 as independent predictor for survival. *Cancer Res*, 2004. **64**(9): p. 3103-11.
213. Dimova, I., et al., Correlations between c-myc gene copy-number and clinicopathological parameters of ovarian tumours. *Eur J Cancer*, 2006. **42**(5): p. 674-9.
214. Otto, T., et al., Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell*, 2009. **15**(1): p. 67-78.
215. den Hollander, J., et al., Aurora kinases A and B are up-regulated by Myc and are essential for maintenance of the malignant state. *Blood*, 2010. **116**(9): p. 1498-505.
216. Kwon, Y.W., et al., Pten regulates Aurora-A and cooperates with Fbxw7 in modulating radiation-induced tumor development. *Mol Cancer Res*, 2012. **10**(6): p. 834-44.
217. Sarkissian, M., R. Mendez, and J.D. Richter, Progesterone and insulin stimulation of CPEB-dependent polyadenylation is regulated by Aurora A and glycogen synthase kinase-3. *Genes Dev*, 2004. **18**(1): p. 48-61.
218. Fumoto, K., et al., AIP regulates stability of Aurora-A at early mitotic phase coordinately with GSK-3beta. *Oncogene*, 2008. **27**(32): p. 4478-87.
219. Dar, A.A., A. Belkhiri, and W. El-Rifai, The aurora kinase A regulates GSK-3beta in gastric cancer cells. *Oncogene*, 2009. **28**(6): p. 866-75.
220. Yang, H., et al., Aurora-A kinase regulates telomerase activity through c-Myc in human ovarian and breast epithelial cells. *Cancer Res*, 2004. **64**(2): p. 463-7.
221. Chefetz, I., et al., Inhibition of Aurora-A kinase induces cell cycle arrest in epithelial ovarian cancer stem cells by affecting NFkB pathway. *Cell Cycle*, 2011.

10(13): p. 2206-14.

222. Gingras, A.C., et al., Analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(8): p. 645-54.

223. Dunham, W.H., M. Mullin, and A.C. Gingras, Affinity-purification coupled to mass spectrometry: basic principles and strategies. *Proteomics*, 2012. **12**(10): p. 1576-90.

224. Ong, S.E., et al., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2002. **1**(5): p. 376-86.

225. Blagoev, B., et al., A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat Biotechnol*, 2003. **21**(3): p. 315-8.

226. Ibarrola, N., et al., A proteomic approach for quantitation of phosphorylation using stable isotope labeling in cell culture. *Anal Chem*, 2003. **75**(22): p. 6043-9.

227. Koh, G.C., et al., Analyzing protein-protein interaction networks. *J Proteome Res*, 2012. **11**(4): p. 2014-31.

228. Magrane, M. and U. Consortium, UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database (Oxford)*, 2011. **2011**: p. bar009.

229. Turinsky, A.L., et al., Literature curation of protein interactions: measuring agreement across major public databases. *Database (Oxford)*, 2010. **2010**: p. baq026.

230. Shannon, P., et al., Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*, 2003. **13**(11): p. 2498-504.

231. Wang, J., et al., Recent advances in clustering methods for protein interaction networks. *BMC Genomics*, 2010. **11 Suppl 3**: p. S10.

232. Ashburner, M., et al., Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet*, 2000. **25**(1): p. 25-9.

233. Croft, D., et al., Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D691-7.

234. Kanehisa, M. and S. Goto, KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(1): p. 27-30.

235. Bessarabova, M., et al., Knowledge-based analysis of proteomics data. *BMC Bioinformatics*, 2012. **13 Suppl 16**: p. S13.

236. Sardon, T., et al., Uncovering new substrates for Aurora A kinase. *EMBO Rep*, 2010. **11**(12): p. 977-84.

237. Kettenbach, A.N., et al., Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Sci Signal*, 2011. **4**(179): p. rs5.

238. Manfredi, M.G., et al., Characterization of Alisertib (MLN8237), an investigational small-molecule inhibitor of aurora A kinase using novel in vivo pharmacodynamic

- assays. Clin Cancer Res, 2011. **17**(24): p. 7614-24.
239. Cremet, J.Y., et al., Preparation and characterization of a human aurora-A kinase monoclonal antibody. Mol Cell Biochem, 2003. **243**(1-2): p. 123-31.
240. Schindelin, J., et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
241. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 671-5.
242. Shevchenko, A., et al., Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal Chem, 1996. **68**(5): p. 850-8.
243. Havlis, J., et al., Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. Anal Chem, 2003. **75**(6): p. 1300-6.
244. Shilov, I.V., et al., The Paragon Algorithm, a next generation search engine that uses sequence temperature values and feature probabilities to identify peptides from tandem mass spectra. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(9): p. 1638-55.
245. Keller, A., et al., Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. Anal Chem, 2002. **74**(20): p. 5383-92.
246. Nesvizhskii, A.I., et al., A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. Anal Chem, 2003. **75**(17): p. 4646-58.
247. Choi, H., et al., SAINT: probabilistic scoring of affinity purification-mass spectrometry data. Nat Methods, 2011. **8**(1): p. 70-3.
248. Smoot, M.E., et al., Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. Bioinformatics, 2011. **27**(3): p. 431-2.
249. Martin, A., et al., BisoGenet: a new tool for gene network building, visualization and analysis. BMC Bioinformatics, 2010. **11**: p. 91-100.
250. Bader, G.D. and C.W. Hogue, An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. BMC Bioinformatics, 2003. **4**: p. 2-29.
251. Bindea, G., et al., ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics, 2009. **25**(8): p. 1091-3.
252. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science, 2002. **296**(5567): p. 550-3.
253. Sui, G., et al., A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(8): p. 5515-20.
254. Yu, J.Y., S.L. DeRuiter, and D.L. Turner, RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6047-52.

255. Specht, K.M. and K.M. Shokat, The emerging power of chemical genetics. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(2): p. 155-9.
256. Yu, T.W., et al., Mutations in WDR62, encoding a centrosome-associated protein, cause microcephaly with simplified gyri and abnormal cortical architecture. *Nat Genet*, 2010. **42**(11): p. 1015-20.
257. Bogoyevitch, M.A., et al., WD40-repeat protein 62 is a JNK-phosphorylated spindle pole protein required for spindle maintenance and timely mitotic progression. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 21): p. 5096-109.
258. Zeng, S., et al., WD40 repeat-containing 62 overexpression as a novel indicator of poor prognosis for human gastric cancer. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(17): p. 3752-62.
259. Zhang, Y., et al., Overexpression of WDR62 is associated with centrosome amplification in human ovarian cancer. *J Ovarian Res*, 2013. **6**(1): p. 55-61.
260. Wollnik, B., A common mechanism for microcephaly. *Nat Genet*, 2010. **42**(11): p. 923-4.
261. Bilguvar, K., et al., Whole-exome sequencing identifies recessive WDR62 mutations in severe brain malformations. *Nature*, 2010. **467**(7312): p. 207-10.
262. Nicholas, A.K., et al., WDR62 is associated with the spindle pole and is mutated in human microcephaly. *Nat Genet*, 2010. **42**(11): p. 1010-4.
263. Thornton, G.K. and C.G. Woods, Primary microcephaly: do all roads lead to Rome? *Trends Genet*, 2009. **25**(11): p. 501-10.
264. Marthiens, V. and R. Basto, [From centrosomes to microcephaly: follow the link]. *Med Sci (Paris)*, 2014. **30**(2): p. 133-6.
265. Chen, J.F., et al., Microcephaly disease gene Wdr62 regulates mitotic progression of embryonic neural stem cells and brain size. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 1-13.
266. Lim, N.R., et al., Opposing roles for JNK and Aurora A in regulating WD40-Repeat Protein 62 association with spindle microtubules. *J Cell Sci*, 2014.
267. Xu, D., et al., Microcephaly-associated protein WDR62 regulates neurogenesis through JNK1 in the developing neocortex. *Cell Rep*, 2014. **6**(1): p. 104-16.
268. Spektor, A., et al., Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell*, 2007. **130**(4): p. 678-90.
269. Bettencourt-Dias, M., et al., Centrosomes and cilia in human disease. *Trends Genet*, 2011. **27**(8): p. 307-15.
270. Delgehyr, N. and N. Spassky, [Interplay between primary cilia and cell cycle]. *Med Sci (Paris)*, 2014. **30**(11): p. 976-9.
271. Kornev, A.P. and S.S. Taylor, Dynamics-Driven Allostery in Protein Kinases. *Trends Biochem Sci*, 2015. **40**(11): p. 628-647.

272. Armean, I.M., K.S. Lilley, and M.W. Trotter, Popular Computational Methods to Assess Multiprotein Complexes Derived From Label-Free Affinity Purification and Mass Spectrometry (AP-MS) Experiments. *Mol Cell Proteomics*, 2013. **12**(1): p. 1-13.
273. Papasaikas, P., et al., Functional splicing network reveals extensive regulatory potential of the core spliceosomal machinery. *Mol Cell*, 2015. **57**(1): p. 7-22.