



HAL
open science

Analyse de la prolifération cellulaire et de l'aneuploïdie dans les mutants sas-4 et aurA chez *Drosophila melanogaster*

Renaud Caous

► **To cite this version:**

Renaud Caous. Analyse de la prolifération cellulaire et de l'aneuploïdie dans les mutants sas-4 et aurA chez *Drosophila melanogaster*. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2016. Français. NNT : 2016REN1B011 . tel-01691663

HAL Id: tel-01691663

<https://theses.hal.science/tel-01691663>

Submitted on 24 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.

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

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

Ecole doctorale VAS
Ecole Doctorale Vie – Agro - Santé

Renaud Caous

Préparée à l'unité de recherche UMR6290 CNRS, IGDR
Institut de Génétique et Développement de Rennes
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

Analyse de la
prolifération cellulaire
et de l'aneuploïdie
dans les mutants *sas-4*
et *aura-A* chez
Drosophila
melanogaster

Thèse soutenue à Rennes
Le 21 Septembre 2016

Devant le jury composé de :

Dr Jean-René HUYNH

DR2 CNRS – Institut Curie – UMR 3215 CNRS –
U934 Inserm / *rapporteur*

Dr Lionel PINTARD

DR2 CNRS – IJM – UMR 7592 / *rapporteur*

Dr Sylvie TOURNIER

DR2 CNRS – CBI Toulouse – LBCMCP – UMR5088 /
examinatrice

Pr Gilles SALBERT

PU UR1 – IGDR – UMR6290 / *examineur*

Dr Régis GIET

DR2 CNRS – IGDR – UMR6290 / *directeur de thèse*

Dr Laurent RICHARD-PARPAILLON

MCU UR1 – IGDR – UMR6290 / *co-directeur de*
thèse

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes sincères remerciements au Dr Jean-René Huynh et au Dr Lionel Pintard pour avoir accepté de m'accorder du temps afin de juger mes travaux de thèse.

Je remercie le Dr Sylvie Tournier et le Pr Gilles Salbert d'avoir accepté de faire partie du jury qui évalue cette thèse.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse, mon tuteur, le Dr Georges Baffet, ainsi que le Dr Anne Pacquelet, et le Dr Xavier Le Goff pour leur aide, leurs précieux conseils, leur implication et leurs encouragements.

Un grand merci à toute l'équipe Cytosquelette et Prolifération Cellulaire et tout particulièrement à mes deux directeurs de thèse Régis et Laurent.

Régis, merci de m'avoir accueilli en M2 dans ton équipe et de m'avoir fait confiance. Merci pour tout le temps et l'implication que tu as eu à ce moment-là pour me préparer aux oraux de M2 et de VAS. Merci également pour tout ce que tu m'as appris durant cette thèse, pour avoir toujours été disponible quand j'avais besoin, pour m'avoir laissé beaucoup de liberté dans mon travail, permis d'assister à de nombreux congrès, pour avoir toujours eu confiance en moi, pour m'avoir aidé à préparer la suite et pour les blagues rafraîchissantes du vendredi ! J'espère que nos chemins se recroiseront dans le futur et je te souhaite toute la réussite que tu mérites.

Laurent, merci beaucoup pour tout le temps que tu as passé à corriger cette thèse, pour ta bonne humeur toujours au rendez-vous (et surtout le vendredi !), pour tes excellents conseils scientifiques, ta disponibilité et toute l'aide que tu m'as apporté. Je te souhaite également le meilleur pour la suite.

Un grand merci à Aude, notre lab' manageuse exceptionnelle. Merci de m'avoir accueilli dans ton bureau au départ de Manu, merci pour tout ce que tu m'as transmis au cours de ces quatre années, pour nos discussions sport et santé entre autres ! Pour la patience et la pédagogie dont tu fais preuve et, désolé si je n'ai pas été à la hauteur dans la pêche aux infos ! J'ai été très content de travailler avec toi. Je te souhaite le meilleur pour la suite de ta carrière et bon courage tant qu'il n'y aura que des mecs dans l'équipe !

Mathieu, je te souhaite le meilleur pour la suite de ta thèse (et je ne m'en fais pas trop pour ça), continue dans la même direction et avec la bonne humeur qui est la tienne (et promis tu vas le récupérer mon bureau ;-)).

J'ai vraiment pris du plaisir à travailler avec vous pendant cette thèse et je vous remercie encore pour tout ce que vous m'avez apporté.

Ensuite je voudrais remercier Manu, ancien membre de l'équipe. Merci pour tout, merci pour avoir été présent au début pour les manip' et pour m'avoir aidé à m'intégrer. Merci pour ton aide pendant mon M2 et pendant les deux années de thèse que nous avons partagé. J'ai beaucoup apprécié de travailler avec toi, les mardis débrifs Top Chef, les quelques soirées Amaryllis etc... J'espère te recroiser dans les prochaines années (comme en septembre dernier à Heidelberg).

Je souhaite remercier le Dr Claude Prigent, directeur de l'IGDR, pour m'avoir accueilli dans son institut et permis d'effectuer ces quatre années de thèse à l'IGDR. Je remercie toute l'équipe de direction et de gestion pour leur aide précieuse et surtout Gérard

pour les débats rugbystiques enrichissants. Merci aussi à Laurence, Denis et Franck de l'équipe TIPS pour les bons moments passés en congrès.

Ensuite, je remercie le Dr Yann Audic pour m'avoir laissé effectuer mon stage de M1 avec lui et Maud pour m'avoir énormément aidé durant ce stage (et notamment à apprivoiser les xénopes). Merci également à Claire et Elisa pour les moments partagés durant ce court stage ! Je tiens également à remercier Mr Bruno Jacob de m'avoir accueilli, lors de mon stage de L3, dans sa jeune entreprise, merci aussi à toute l'équipe, Sandrine, Patricia et Aurélie pour leur bonne humeur, leurs conseils scientifiques (débrouille et Farmville !) et leur soutien dans un moment difficile. Même si l'on ne s'est pas revu depuis, je n'ai pas oublié AlgiePlus ! Merci à toute l'équipe pédagogique de SVE de m'avoir permis de faire deux années de monitorat durant ma thèse. Ces deux ans m'ont beaucoup apporté sur les plans professionnel et personnel (et passer de l'autre côté du miroir n'est pas si mal !)

Un immense merci aux anciens thésards de l'institut qui étaient présents quand je suis arrivé : Leslie, Benoit, Manu, Jocelyn, Nico et Claire qui m'ont accueilli avec eux et avec qui j'ai passé de supers moments comme les TCM ou encore ce premier Noël des doctorants ! Merci à tous les actuels thésards et les autres membres de l'institut que j'ai pu côtoyer, Anthony P., Benjamin M., Charlotte M., Christophe H., Claire D., Daniel G., David R., Edouard Q., Emmanuelle D., Fériel B., Géraldine D., Géraldine L. P., Ghislain G., Guillaume H., Haffida S., Karen B., Kévin M., Laura B., Mélanie R., Perrine U., Ronan U., toute l'équipe S@RTE, Stéphane D., Sylvain P., Thomas D., et toutes les personnes que j'ai pu oublier.

Merci enfin à tous les membres de l'IGDR pour ce qu'ils m'ont apporté de près ou de loin.

Je voudrais continuer en remerciant chaleureusement toutes les personnes que j'ai croisé durant mon parcours universitaire. UN TRES GRAND MERCI à Thomas tout d'abord, je me souviens de ce jour de fin septembre 2007 où tu m'as demandé si j'aimais bien The Police ! La suite s'écrit encore près de 10 ans plus tard et, je l'espère pour encore un très long moment. J'attends mon discours en Breton aussi ;) . Merci aussi à la longue lignée de mes binômes. Axel même si tout n'a pas été facile, loin de là, on a formé un bon duo et maintenant je souhaite vraiment que l'on se recroise. Hélène, vraiment un très grand merci pour avoir été à mes côtés durant mes études, on a partagé beaucoup de choses et même si le temps maintenant nous éloigne un peu, j'espère que l'on gardera contact. Je ne peux pas non plus oublier tous ceux avec qui j'ai partagé d'excellents moments durant mes études, Anne-Claire et Anne-Claire, Marion, Damien YMCA (on s'arrête sur le W ! J'en ris encore), Erwan, Geoffrey, et tous les autres.

Un énorme merci aussi aux amis, Romain, Jonathan, Alizée, Guillaume, Mathieu, Pauline pour tout le soutien, l'aide, la compréhension et la folie que vous m'avez apporté. Rennes est très loin ;) et je ne vous vois pas autant que je le voudrais mais à chaque fois que l'on est ensemble, c'est une vraie bouffée d'oxygène. Merci Pauline pour les midis (a)sociaux devant une bonne grille de mots fléchés !! :D. Vous aurez toujours une place importante chez moi (peu importe où que ce soit).

Merci aussi à ma famille pour tout le soutien et l'aide que vous m'apportez, merci de toujours croire en moi et d'avoir toujours tout fait pour que je réussisse malgré les difficultés. Une pensée émue pour mon père malgré tout.

Pour toi mon n'Elise, un merci (et un paragraphe entier) ne suffirait pas, merci d'être à mes côtés, de me soutenir, de m'encourager, de me supporter, de m'accepter, de rendre ma vie meilleure. Finie maintenant cette période compliquée, un chapitre se tourne et un nouveau encore meilleur va s'écrire en anglais pour tous les deux ! Un grand merci également à ta famille pour leur soutien.

Merci aussi à la famille Rugby, le PARC et toute l'équipe de l'USAR pour ces dernières années sportives riches en émotions et formidables sur le plan humain. J'ai rencontré de très belles personnes que je n'oublierai jamais et j'espère que l'on aura de nombreuses occasions de se retrouver autour du terrain et d'une bonne bière.

Pardon à tous ceux que j'ai oublié.

Un grand merci également à Mme P., professeur de Français, qui m'a dit un jour « Renaud, tu ne feras jamais rien de ta vie » ...

*« N'essaie pas ! Fais-le ou ne le fais pas, mais il n'y a pas d'essai »
Maître Yoda : Episode V, L'empire contre-attaque*

Liste des abréviations

A-box : Aurora-A box
ADN : Acide Désoxyribonucléique
APC/C : Anaphase Promoting Complex / Cyclosome
ARN : Acide RiboNucléique
ARNi : interférence à l'ARN
ATP/ADP : Adénosine TriPhosphate / Adénosine DiPhosphate
AurA : Aurora-A
Bub : Budding Uninhibited by Benzimidazole
ChIP : Chromatin Immunoprecipitation
CycB : Cycline B
D-box : Destruction box
DUB : Désubiquitylase
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching, redistribution de fluorescence après photo-blanchiment
FRET : Förster Resonance Energy Transfer, transfert d'énergie par résonance de type Förster
G1 : Gap 1
G2 : Gap 2
GFP : Green Fluorescent Protein, protéine à fluorescence verte
GMC : Ganglion Mother Cell
INP : Intermediate Neural Progenitor, progéniteurs neuraux intermédiaires
Ip11 : Increase in ploidy 1
KMN : KNL1 – Mis12 – Ndc80
Kt : Kinétochores
M : Mitose
Mad : Mitosis Arrest Deficient
MCC : Mitosis Checkpoint Complex, Complexe du point de Contrôle de Mitose
Mt : Microtubules
Mt-Kt : Attachement Microtubule – Kinétochore
Nb : Neuroblastes larvaires de *Drosophila melanogaster*
PAR : Partitioning defective
PCM : matériel péri-centriolaire
Plk1 : Polo like kinase 1
PP1 : Protéine Phosphatase 1
PP2A : Protéine Phosphatase 2A
PP6 : Protéine Phosphatase 6
S : Synthèse
S « 123 » : Sérine 123
SAC : Spindle Assembly Checkpoint, Point de Contrôle d'Assemblage du Fuseau Mitotique
SNC : Système Nerveux Central de la larve de *Drosophila melanogaster*
SOP : Sensory Organ Precursor, cellules souches précurseur des organes sensoriels
T « 123 » : Thréonine 123
TPX2 : Targeting protein for Xklp2
 γ -tub : γ -tubuline

Table des matières

Introduction.....	1
I. AVANT-PROPOS	3
II. LA KINASE AURA.....	5
A. STRUCTURE DE LA KINASE	7
B. LA REGULATION D'AURA	8
1. <i>Au niveau transcriptionnel.....</i>	<i>8</i>
2. <i>Au niveau post-traductionnel.....</i>	<i>8</i>
3. <i>Au niveau de la dégradation dépendante du protéasome</i>	<i>12</i>
C. LES ROLES D'AURA EN MITOSE	17
1. <i>Les activateurs d'AurA pour ses fonctions aux centrosomes</i>	<i>17</i>
2. <i>Les fonctions d'AurA au centrosome.....</i>	<i>21</i>
3. <i>L'entrée en mitose.....</i>	<i>25</i>
4. <i>La formation d'un fuseau bipolaire</i>	<i>27</i>
5. <i>Les autres rôles</i>	<i>32</i>
D. LES AUTRES ROLES D'AURA.....	34
1. <i>Etablissement de la polarité cellulaire et orientation du fuseau.....</i>	<i>34</i>
2. <i>Le désassemblage du cil.....</i>	<i>35</i>
3. <i>Interaction avec p53.....</i>	<i>36</i>
4. <i>Rôles divers d'AurA.....</i>	<i>36</i>
E. AURA DANS LES CANCERS	37
III. LE POINT DE CONTROLE D'ATTACHEMENT DU FUSEAU ET LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES.....	41
A. LE POINT DE CONTROLE D'ATTACHEMENT DU FUSEAU	41
1. <i>La mise en place du SAC.....</i>	<i>41</i>
2. <i>La surveillance des défauts Mt-Kt.....</i>	<i>48</i>
3. <i>L'inhibition de l'APC/C.....</i>	<i>50</i>
4. <i>Satisfaction du SAC et sortie de mitose</i>	<i>52</i>
B. SAC ET ANEUPLOÏDIE	55
1. <i>L'aneuploïdie due à des défauts de SAC.....</i>	<i>55</i>
2. <i>Aneuploïdie et tumorigénèse</i>	<i>57</i>
IV. LE NB DE DROSOPHILE	59
A. LES DIFFERENTS TYPES DE NB	59
B. LA POLARITE ET L'ORIENTATION DU FUSEAU DANS LE NB	62
1. <i>La polarité apico-basale</i>	<i>62</i>

2. <i>L'orientation du fuseau</i>	65
C. NB HOMEOSTASIE ET TUMORIGENESE.....	68
V. OBJECTIFS DE THESE	70

Résultats.....73

**ANALYSE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE ET DE L'ANEUPLOÏDIE DANS LES
MUTANTS *SAS-4* ET *AURA* CHEZ *DROSOPHILA MELANOGASTER*..... 74**

A. RESUME.....	74
B. L'ARTICLE : « SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT INACTIVATION FAILS TO SUPPRESS NEUROBLAST TUMOUR FORMATION IN <i>AURA</i> MUTANT <i>DROSOPHILA</i> »	75

Discussion et perspectives.....91

A. UNE FORTE ANEUPLOÏDIE COMPROMET-ELLE LA PROLIFERATION CELLULAIRE ET LA TUMORIGENESE ?	92
B. UN NOUVEAU ROLE D'AURA DANS LA REGULATION DE LA DEGRADATION DE LA CYCB.....	95
1. <i>Hypothèse sur le mécanisme de régulation de la dégradation de la CycB par AurA</i>	96
2. <i>Un rôle conservé ?</i>	102
3. <i>Impact sur les traitements anticancéreux</i>	103

Annexes.....105

Références bibliographiques.....121

Introduction

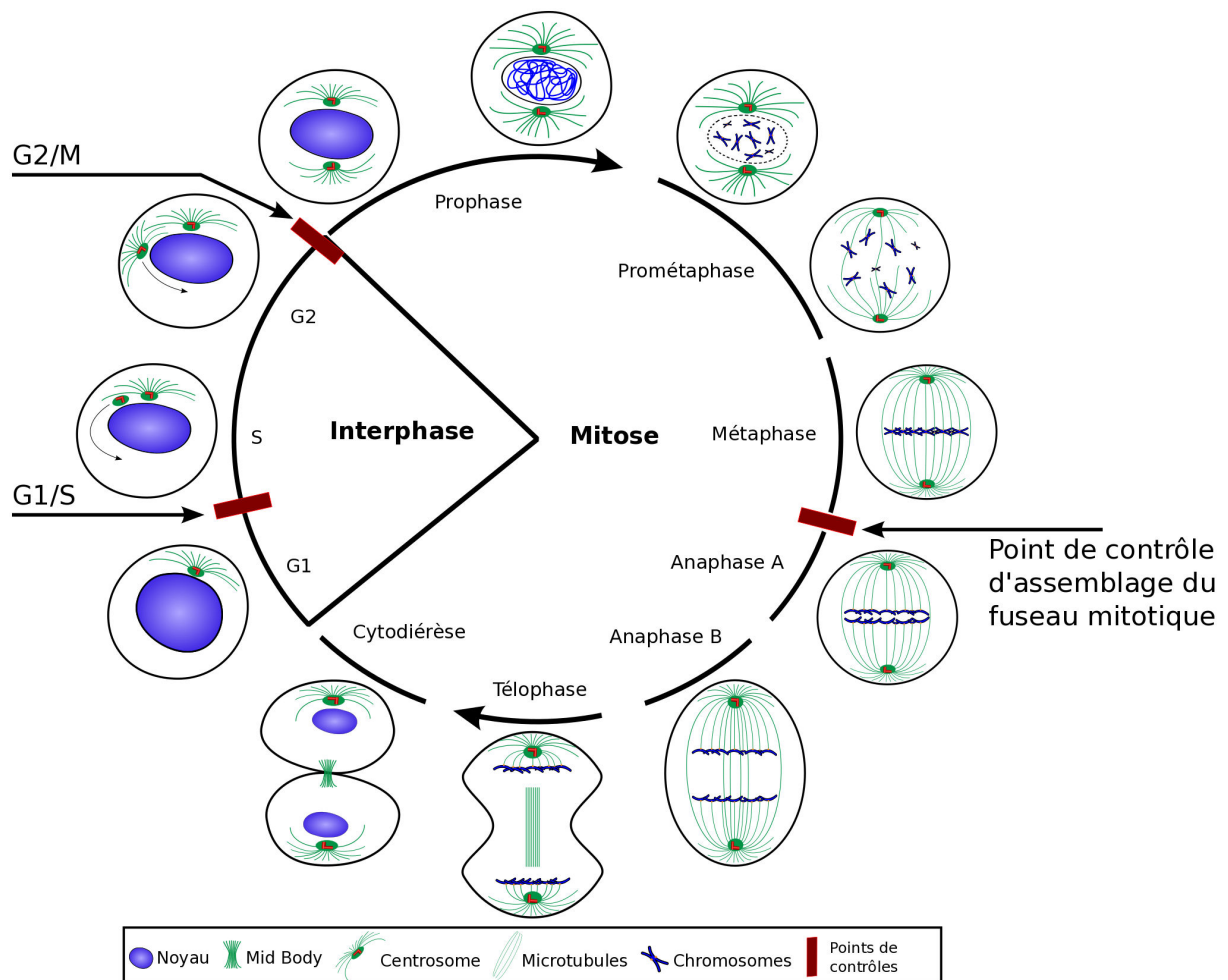


Figure 1 : Le cycle cellulaire et les différents points de contrôles. En interphase, un premier point de contrôle (G1/S) est chargé de vérifier l'état de l'ADN avant le début de la phase de réplication (S). Le second point de contrôle (G2/M) contrôle que la réplication est terminée et s'est correctement déroulée pour éviter la propagation d'erreurs dans le code génétique. Enfin, le troisième point de contrôle, le « spindle assembly checkpoint » ou point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (SAC), est en charge de vérifier que tous les kinétochores de tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau pour éviter une mauvaise ségrégation de l'information génétique dans les deux cellules filles.

I. Avant-propos

Le cycle cellulaire coordonne la vie de la cellule. Il est divisé en plusieurs étapes. La première, appelée phase G1 pour « Gap 1 », est une phase de croissance lors de laquelle la cellule accumule le matériel nécessaire à l'accomplissement de la phase suivante (protéines, acides nucléiques, etc.). Lors de la phase de synthèse, dite phase « S », le matériel génétique sous la forme de chromosomes est dupliqué. Une fois cette duplication correctement achevée, commence la seconde phase de croissance, la phase G2. Cette étape est également une période de croissance et de synthèse protéique. Elle est aussi caractérisée par la séparation et la maturation des centrosomes, structure nécessaire à l'ultime étape du cycle cellulaire. Lorsque tout est prêt, débute la phase M « mitose » ou division cellulaire. C'est lors de cette étape cruciale que la cellule ségrège de manière égale l'information génétique dans les deux cellules filles qui vont se former (Figure 1).

Afin que toutes ces étapes se déroulent correctement, des points de contrôles (ou checkpoints) sont mis en place avant chaque transition de phase (Figure 1). Leur but est de contrôler que tout s'est déroulé correctement et qu'il n'y a aucun risque pour la cellule à passer à l'étape suivante. En cas de problèmes, ils peuvent bloquer la progression du cycle, allant même jusqu'à déclencher la mort par apoptose si les défauts sont trop importants. Parmi eux, le point de contrôle d'assemblage du fuseau (ou « Spindle Assembly Checkpoint », SAC) est le checkpoint le plus important en mitose. Son rôle est de s'assurer que tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau afin d'éviter des erreurs de ségrégation menant à des anomalies de répartition et à une aneuploïdie. Il agit en bloquant la dégradation rapide de la Cycline B (CycB) qui est nécessaire à la sortie de mitose. De nombreuses stratégies anticancéreuses ciblent particulièrement ce checkpoint pour bloquer la prolifération cellulaire et ainsi limiter la croissance tumorale. Cependant, les moyens thérapeutiques actuellement utilisés entraînent de nombreux effets secondaires. Par exemple, les drogues stabilisant ou déstabilisant les microtubules (Mt) ont de graves effets neurotoxiques.

Depuis peu, de nouvelles stratégies émergent et notamment celle de l'inhibition du SAC. Cela entraîne, *in vitro* sur des cellules en culture, une sortie prématurée de mitose et l'apparition d'une forte aneuploïdie conduisant à la mort cellulaire (Janssen, Kops, and Medema 2011). C'est dans cette optique que s'inscrit mon projet de thèse. Nous avons voulu

tester, *in vivo*, si l'induction d'une forte aneuploïdie dans un modèle tumoral chez la mouche (tumeur du système nerveux central de la larve, SNC) était capable d'affecter la prolifération cellulaire et la tumorigénèse. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser une approche utilisant des mutants non fonctionnels du SAC combinés à des mutants impliqués dans la formation du fuseau (pour générer de l'aneuploïdie) et responsables de la formation de tumeurs dans le SNC. Les résultats ont montré qu'avec le mutant du fuseau *sas-4*, l'aneuploïdie générée en absence de SAC actif compromet la prolifération cellulaire et la tumorigénèse. Cependant, de manière très surprenante, pour le mutant *aurora-A (aurA)*, l'absence de SAC actif n'entraîne pas d'aneuploïdie et ne compromet ni la prolifération cellulaire ni la tumorigénèse. Cela nous a conduit à investiguer le rôle d'Aurora-A (AurA) et permis de mettre en évidence un effet de la perte de son activité kinase sur la dégradation d'une protéine majeure de la sortie de mitose, la CycB. La CycB doit être rapidement dégradée après la satisfaction du SAC pour permettre la sortie de mitose et, en absence d'AurA, cette dégradation est fortement ralentie (en présence ou en absence de checkpoint). De façon indépendante du SAC, la mitose se déroule plus lentement, ce qui laisse suffisamment de temps à la cellule pour corriger les problèmes de formation du fuseau et pour correctement ségréger ses chromosomes. Le pouvoir tumorigénique des mutants *aurA* n'est donc pas modifié en absence d'un SAC fonctionnel.

Mes travaux de thèse ont donc permis de mettre en évidence que dans un mutant *sas-4*, une forte aneuploïdie induite compromet la prolifération cellulaire. Cette étude a également mis en lumière un nouveau rôle important pour la protéine AurA dans la dégradation de la CycB et la sortie de mitose chez la drosophile.

II. La kinase AurA

AurA est une sérine/thréonine kinase, dont le site de phosphorylation consensus est défini comme R/K/N-R-X-S/T-B (où B peut être n'importe quel résidu hydrophobe à l'exception de la proline (Ferrari et al. 2005)). Cette kinase a été découverte en 1993-1994 lors d'un crible, effectué chez la levure, visant à identifier de nouveaux gènes impliqués dans la ségrégation des chromosomes (Chan and Botstein 1993; Francisco, Wang, and Chan 1994). Le gène identifié, nommé « increase in ploidy 1 » (Ipl1) code pour le seul orthologue identifié d'AurA chez *S. cerevisiae*. En 1995, David Glover et collaborateurs identifient chez la drosophile un gène important pour la séparation des centrosomes qu'ils nomment « Aurora », en référence aux aurores boréales (Glover et al. 1995). Ils observent que la perte de ce gène cause la formation de fuseaux mitotiques monopolaires et un arrêt en mitose au cours du développement embryonnaire. En 1997, Kimura et collaborateurs identifient l'orthologue humain, une protéine de 402 acides aminés et d'environ 45,9 kilodaltons (kDa). Ils observent qu'elle est surtout retrouvée dans les testicules et dans les cellules en prolifération (dont les cellules cancéreuses HeLa). Les auteurs confirment que la kinase se localise aux pôles du fuseau en mitose et démontrent que ses niveaux d'expression et d'activité sont régulés au cours du cycle. Ils atteignent leur maximum en G2/M puis diminuent ensuite rapidement (Kimura et al. 1997). Par la suite, l'étude de nombreuses lignées tumorales a montré qu'AurA est surexprimée dans de nombreux cancers et que cela est corrélé à l'amplification de la région chromosomique où se situe le gène d'AurA (20q13.2). Elles ont aussi montrée que la surexpression de la kinase constitutivement active était capable de transformer des cellules (Bischoff et al. 1998). Cette découverte a ouvert la voie à de nombreuses recherches sur AurA comme une potentielle cible anti-cancer. La question de sa régulation a été particulièrement investiguée et de nombreuses études sont venues montrer un important rôle mitotique (au niveau du centrosome et du fuseau mitotique) pour AurA. L'implication de la kinase dans d'autres processus commence également à être mise en évidence.

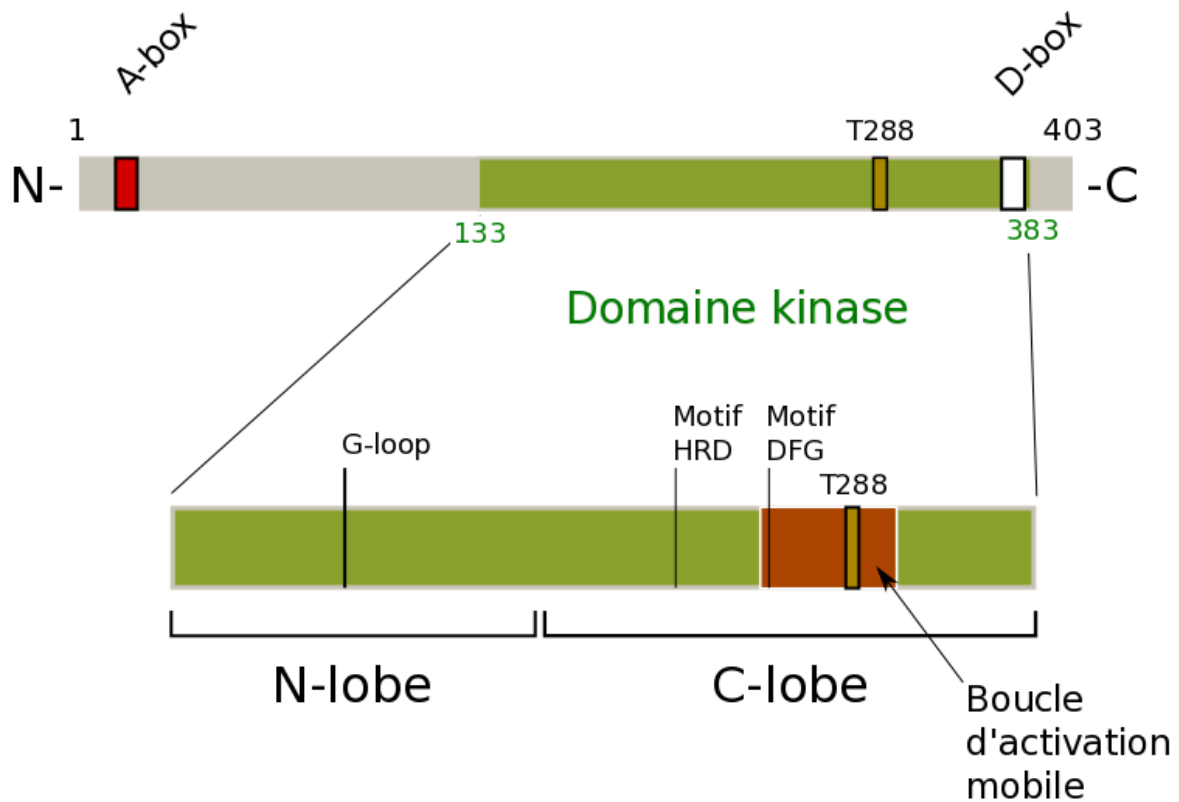


Figure 2 : Structure de la kinase AurA humaine. AurA est une sérine/thréonine kinase de 403 acides aminés qui comprend un domaine kinase (acides aminés 133 à 383). Ce domaine comprend la « G-loop » qui a un rôle dans le transfert de phosphate et l'échange ATP/ADP durant le cycle catalytique. L'association du motif His-Arg-Asp (HRD) et la position de la boucle d'activation mobile, qui commence par le motif Asp-Phe-Gly (DFG), déterminent l'état d'activation de la kinase. Cette boucle contient le résidu T288 dont la phosphorylation est nécessaire à l'activation d'AurA. AurA possède également deux boîtes, la « A-box » en N-terminal et la « D-box » en C-terminal, qui participent à la régulation de sa dégradation.

A. Structure de la kinase

AurA est constituée de 403 acides aminés chez l'homme et 411 chez la drosophile. Elle possède un domaine kinase très conservé au cours de l'évolution entre les acides aminés 133 à 383 chez l'homme (154 à 406 chez la drosophile) (Figure 2). Il est organisé selon un schéma dit en épine « spine » commun à tous les domaines kinase (Kornev and Taylor 2010) : il se compose de deux lobes au cœur desquels se trouve le site actif. La partie N-terminale se compose d'une structure appelée « N-lobe » composée de 5 brins β (β 1-5) organisés en feuillets antiparallèles puis d'une petite hélice α (α B) suivie d'une seconde hélice α (α C). Malgré une certaine rigidité due à la présence d'un feuillet β , le « N-lobe » est très malléable : l'hélice α C va en effet bouger en fonction de l'état d'activation de la kinase. Au sein du feuillet β se trouve également une petite boucle riche en glycine appelée « G-loop » qui joue un rôle important dans le transfert de phosphate et l'échange ATP/ADP durant le cycle catalytique (Kornev and Taylor 2010). La partie C-terminale contient le « C-lobe » composé de 7 hélices α (α D-I) et deux brins β (β 6-9). Il va servir de point d'ancrage pour le substrat. Ce domaine contient le motif « HRD » (His-Arg-Asp en position 254-256) ainsi que la boucle d'activation mobile dont la position et la conformation déterminent si la kinase est active ou non. Cette boucle s'étend des résidus 274 à 299 et commence par un motif de liaison au magnésium « DFG » (Asp-Phe-Gly). Au sein de cette boucle, l'orientation du résidu F275 en direction du site catalytique détermine l'état d'activation de la kinase. Dans cette boucle également, le site de phosphorylation T288 est nécessaire à l'activation par autophosphorylation ou par des partenaires (détaillé dans la partie B de cette introduction). Par exemple, la liaison d'un partenaire majeur « targeting protein for Xk1p2 » (TPX2) permet le placement du résidu T288 phosphorylé en face du résidu R225 du motif « HRD », ce qui forme un pont salin et rend la kinase active (Bayliss et al. 2003; Nikonova et al. 2013).

B. La régulation d'AurA

1. Au niveau transcriptionnel

Le niveau d'ARN messager d'AurA fluctue au cours du cycle pour atteindre son maximum en G2/M (Kimura et al. 1997). La régulation de cette expression transcriptionnelle est encore mal connue mais quelques éléments viennent éclaircir le mécanisme. Le promoteur du gène AurA contient une séquence de 7 paires de base en 5' (CTTCCGG) qui est capable de lier la sous-unité 60 du complexe de transcription « adenovirus E4 gene transcription factor 1 » (E4TF1). La co-expression d'E4TF1-60 et E4TF1-53 augmente l'activité promotrice du gène AurA et la régulation spécifique de son expression au cours du cycle semble mettre en jeu la région CDE/CHR (« cell cycle-dependent element » (CDE) et « cell cycle genes homology region » (CHR)) qui se situe en amont de la région CTTCCGG (Masatsugu Tanaka et al. 2002). Le complexe « thyroid hormone receptor-associated protein 220/ mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1 » (TRAP220/MED1 - un complexe qui recrute sélectivement le complexe TRAP/mediator qui fait le lien entre les protéines de liaison à l'ADN et l'ARN polymérase II) semble également être impliqué. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrent que ce complexe est capable de lier directement le promoteur d'AurA, ce qui est nécessaire à l'expression de ce gène (Udayakumar et al. 2006). Le facteur de transcription « E2F transcription factor 3 » (E2F3) est également capable de se fixer sur le promoteur d'AurA et son expression ectopique entraîne une surexpression de la kinase, un fait observé dans certains cancers de l'ovaire (He et al. 2008).

2. Au niveau post-traductionnel

a. Activation par le calcium

AurA a besoin d'être activée afin de pouvoir jouer son rôle de kinase. Une des voies d'activation passe par le calcium (Ca^{2+}). Il a été montré que des *stimuli* causant le relargage du Ca^{2+} de ses réserves intracellulaires sont suffisant pour activer rapidement et transitoirement AurA. Cette activation est modulée par la liaison directe de la protéine « Ca^{2+} dépendant calmodulin » (CaM) sur de multiples motifs de la kinase en N- et C-terminal (notamment entre les acides aminés 33 et 89). La phosphorylation des sérines S51, S53 ou S54 et S66/S67 est importante pour la régulation de la liaison de CaM. Cette activation d'AurA dépendante

du calcium est requise pour le désassemblage du cil (décrit en partie II.D.2.) et pour la progression en mitose *via* la modulation de l'interaction d'AurA avec son partenaire « neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 9 » (NEDD9 - décrit en partie II.C.1.b.) (Plotnikova et al. 2010; Plotnikova et al. 2012).

b. Activation par phosphorylation

La voie d'activation principale d'AurA passe par la phosphorylation de plusieurs résidus et a été largement étudiée. La première évidence d'une régulation par phosphorylation vient des travaux d'Andrésson et Ruderman qui montrent que cela est nécessaire pour la transition G2/M (Andrésson and Ruderman 1998). Le résidu le plus important est la thréonine T288 comprise dans la boucle d'activation du domaine catalytique (« T-loop »). Sa phosphorylation est régulée et nécessaire à l'activation d'AurA au cours du cycle et correspond à un mécanisme conservé d'activation des sérine/thréonine kinases (Littlepage et al. 2002; Walter et al. 2000). Il est proposé aujourd'hui un modèle dans lequel AurA est capable de s'auto-activer par autophosphorylation sur la T288. Le mécanisme mis en jeu est encore débattu entre d'une part, une activation intramoléculaire supportée par des données biochimiques et de modélisation et, d'autre part, un mécanisme intermoléculaire supporté par des données biochimiques et de cristallographie (Dodson et al. 2013; Zorba et al. 2014).

Un important médiateur de la phosphorylation de la T288 est TPX2. TPX2 est le partenaire majeur d'AurA (et le plus étudié) capable de l'activer au niveau du fuseau (décrit en partie II.C.3.a.). L'interaction entre AurA et TPX2 a été mise en évidence suite à un crible protéomique sur extrait mitotique de cellules HeLa. Dans cette étude, les auteurs ont montré que la partie N-terminale de TPX2 est capable, seule, d'interagir directement avec la partie C-terminale d'AurA (Kufer et al. 2002). Une analyse par cristallographie de l'interaction entre TPX2 et AurA a mis en évidence que lorsque TPX2 n'est pas lié à la kinase, la T288 est dans une configuration qui la rend accessible aux phosphatases. Inversement, la liaison de TPX2 empêche l'inactivation d'AurA par les phosphatases (Eyers et al. 2003; Tsai et al. 2003) et bloque AurA dans une conformation active (Bayliss et al. 2003). Elle permet également à AurA de s'auto-phosphoryler. L'ajout *in vitro* de TPX2 avec AurA déphosphorylée entraîne sa re-phosphorylation dépendante de l'ATP. Il a également été démontré que seule la partie N-terminale de TPX2 est nécessaire pour activer AurA *in vitro* et bloquer l'action de la protéine phosphatase PP1 (Eyers and Maller 2004). Récemment, il a été suggéré que la liaison

de TPX2 à AurA active la kinase de manière allostérique en plaçant la boucle d'activation de la kinase dans une configuration « active » malgré l'absence de phosphorylation sur la T288 *in vitro* (Dodson and Bayliss 2012; Zorba et al. 2014). Ce mécanisme pourrait être valable *in vivo* car des travaux réalisés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* montrent un « pool » d'AurA lié à TPX2 sur le fuseau et exempt de phosphorylation sur la T201 (T288) (Toya et al. 2011). De manière intéressante, la phosphorylation de TPX2 par Plx1, l'homologue chez le xénope de « polo-like kinase 1 » (Plk1), augmente sa capacité à activer AurA (Eckerdt et al. 2009).

L'activation d'AurA semble également impliquer le complexe CycB-Cdk1. L'activité kinase de « cyclin-dependent kinase 1 / cell division cycle protein 2 homolog » (Cdk1/Cdc2) est nécessaire et suffisante pour permettre la phosphorylation d'AurA et son activation dans des ovocytes de xénope. Cdk1 ne semble pas la phosphoryler directement mais permettrait plutôt son activation par l'inhibition des protéines phosphatases PP1 ou PP2A (Marumoto et al. 2002; Maton et al. 2003; Maton et al. 2005). D'autres sites de phosphorylation d'AurA ont été identifiés. Chez le xénope, sont retrouvés les sites S12, S53, T103, S116, T122, T295, S349 mais seul le site T295 (qui correspond au T288 humain) semble nécessaire à son activation (Eyers and Maller 2004; Haydon et al. 2003). La protéine kinase « LIM domain kinase 2 » (LIMK2), qui est un substrat d'AurA, régule également son activation en exerçant un rétrocontrôle positif. AurA phosphoryle LIMK2 sur les résidus S283, T494 et T505, ce qui régule son activité kinase et son niveau protéique en inhibant son ubiquitinylation et sa dégradation. En réponse, le domaine LIM de LIMK2 permet sa liaison à AurA et cela favorise, en association avec son activité kinase, la stabilisation d'AurA (Johnson et al. 2012).

Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que la protéine inhibitrice des phosphatases « phosphatase inhibitor 2 » (I-2) stimule directement l'activité d'AurA. Cela ne semble pas dû à l'inhibition de PP1 car l'activation d'AurA n'est pas perturbée par la délétion du motif de liaison d'I-2 sur PP1. Les auteurs suggèrent que I-2 est un activateur allostérique (comme TPX2) en plus d'un inhibiteur de PP1 pour l'activation d'AurA (Satinover et al. 2004).

D'autres interacteurs d'AurA ayant un rôle d'activateurs locaux sont présentés en partie II.C. et Tableau 1.

c. Régulation *via* les phosphatases

Comme l'activation d'AurA passe par la phosphorylation de la T288, les phosphatases jouent un rôle important dans l'inactivation de la kinase. La phosphatase PP1 est capable, *in vitro*, de déphosphoryler AurA et, *in vivo*. L'acide okadaïque (un inhibiteur des phosphatases) est capable d'augmenter la phosphorylation d'AurA (Walter et al. 2000). AurA possède deux sites de liaison pour PP1 et cette liaison est maximale en mitose. PP1 est capable, *in vitro*, de déphosphoryler AurA pour l'inactiver. *In vivo*, les mutants d'AurA incapables de lier PP1 sont donc hyperphosphorylés mais, de manière inattendue, leur activité est réduite (Katayama et al. 2001). Cette baisse d'activité est probablement due au fait que la perte d'interaction entre les deux protéines entraîne une trop forte phosphorylation d'AurA et que certaines de ces phosphorylations sont déstabilisatrices (la S349 chez le xénope) (Pascreau et al. 2008). A ce jour, le rôle de PP1 sur l'inactivation d'AurA n'est pas clairement démontré, cette interaction semble plutôt nécessaire au bon déroulement de la mitose.

Une autre phosphatase qui semble être impliquée dans la régulation d'AurA est PP2A. Les deux protéines co-localisent aux pôles du fuseau mitotique durant la mitose, sont présentes dans le même complexe et sont chacune nécessaires pour la localisation de l'autre. En pratique, la phosphorylation de la sérine S51 d'AurA permet la liaison de PP2A à AurA et les auteurs suggèrent que cette association entraîne la dégradation d'AurA *via* le protéasome (décrit en partie II.B.3.) en déphosphorylant cette sérine (Horn et al. 2007).

Le complexe phosphatase majeur pour l'inactivation d'AurA est PP6. La déplétion de PP6 en cellule humaine entraîne une augmentation de l'activité kinase d'AurA en stabilisant le complexe AurA-TPX2 et sa phosphorylation sur la T288. PP6 est à ce jour la seule phosphatase montrée comme capable de déphosphoryler AurA dans sa « T-loop » bien que le mécanisme ne soit pas encore identifié (Hammond et al. 2013; Zeng et al. 2010).

d. Inactivation intramoléculaire

En plus de l'effet des phosphatases pour inactiver une AurA déjà active, il existe un mécanisme intramoléculaire qui prévient l'auto-activation de la kinase. En conformation inactive, la partie N-terminale de la kinase (domaine Nt, 1-128) interagit et bloque la partie C-terminale catalytique (domaine Cd, 129-403, domaine d'activation et domaine kinase). Le

retrait de la partie N-terminale d'AurA induit une plus grande activité kinase (Zhang et al. 2007). Ce mécanisme d'auto-inhibition peut être bloqué par l'action d'un activateur d'AurA, Ajuba. Ajuba est une protéine à domaine LIM (domaine qui participe aux interactions protéine-protéine) capable d'induire l'autophosphorylation d'AurA en se liant sur la partie N-terminale pour inhiber l'interaction entre les Nt et Cd (Bai et al. 2014).

3. Au niveau de la dégradation dépendante du protéasome

a. Dégradation dépendante de la voie de l'ubiquitine

En fin de mitose, AurA est rapidement dégradée et un traitement par des inhibiteurs du protéasome empêche cette dégradation et entraîne un enrichissement en forme poly-ubiquitinylée d'AurA par « l'anaphase promoting complexe / cyclosome » (APC/C), une E3 ubiquitine ligase (Honda et al. 2000). Chez le xénope, deux boîtes de dégradations « D-box » au motif RxxL ont été identifiées dans la partie C-terminale, les D1 (acides aminés 293-301, contient la T295) et D2 (acides aminés 378-385), et sont conservées au cours de l'évolution (Figure 2). La mutation des deux boîtes RxxL en RxxI entraîne la perte de l'ubiquitinylation de la kinase et de sa destruction (Arlot-Bonnemains et al. 2001). Il existe également une autre boîte, en N-terminal, qui confère la spécificité de dégradation d'AurA (les « D-box » étant présentes aussi chez Aurora-B (AurB)), la « D-box activating domain » ou DAD (acides aminés 44-55) (Castro, Vigneron, et al. 2002). Ce domaine DAD est crucial pour permettre l'activation du signal de dégradation des D1 et D2, et notamment la sérine S53 (Horn et al. 2007) (Figure 2). Des travaux réalisés en parallèle, toujours chez le xénope, ont apporté les mêmes conclusions quant à la nécessité des « D-box » et de la « DAD » ou de la « A-box » qu'ils ont identifié (acides aminés 34-68). Ils montrent également que la mutation de la S53 en Asp bloque la destruction d'AurA et proposent que la déphosphorylation de la S53 en fin de mitose permet sa dégradation (Littlepage and Ruderman 2002). Ces séquences et l'importance de la S53 ont été confirmées chez l'homme quelques années plus tard (Crane, Kloepfer, and Ruderman 2004; Kitajima et al. 2007).

Afin d'ubiquitinyler ses substrats, l'APC/C agit avec l'aide de cofacteurs ; « cell-division cycle protein 20 / fizzy » (Cdc20) et « fizzy/cell division cycle 20 related 1 » (Cdh1), qui lui permettent une spécificité de substrat spatio-temporelle. D'abord identifié chez le xénope puis chez l'humain, le cofacteur qui est associé à la dégradation d'AurA est Cdh1. En

effet, l'expression ectopique de Cdh1 suffit à entraîner la dégradation d'AurA alors que celle de Cdc20 n'en est pas capable (Castro, Arlot-Bonnemains, et al. 2002; Crane, Kloepper, and Ruderman 2004; Littlepage and Ruderman 2002; Taguchi et al. 2002). Cette dégradation *via* Cdh1 requiert également l'activité de la kinase Plk1. Plk1 contrôle la phosphorylation de Cdc14A qui va elle-même contrôler la phosphorylation de Cdh1 et lui permettre d'être pleinement active pour la dégradation d'AurA ; Plk1 va donc entraîner la dégradation d'AurA en activant (indirectement) l'APC/C-Cdh1 (Leuken et al. 2009). Le rôle important de la kinase Plk1 dans les fonctions d'AurA est détaillé plus loin (Partie II.C.2.c.).

D'autres E3 ligases sont également capables de réguler l'ubiquitination d'AurA. Parmi elles, « checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase » (Chfr) est capable d'interagir physiquement avec AurA et de l'ubiquitiner *in vitro* et *in vivo*. Dans des fibroblastes, il a été montré que le niveau de la kinase est inversement proportionnel à celui de Chfr, mais le mécanisme précis reste à élucider (Yu et al. 2005). AurA et une autre E3 ligase « Skp-cullin1-F-box protein, F-box and leucine-rich repeat protein 7 » (SCF^{FBXL7}) localisent toutes deux au centrosome durant la formation du fuseau. Le composant de ce complexe, FBXL7, interagit avec AurA en mitose et est capable de la poly-ubiquitiner afin, d'après les auteurs, de contrôler son niveau spécifiquement en mitose (Coon et al. 2012).

Des phosphorylations ou des protéines partenaires vont être capable de moduler l'ubiquitination et la dégradation d'AurA par Cdh1. La liaison de TPX2 suffit, par exemple, à protéger AurA car, dans des cellules déplétées en TPX2, la réexpression du fragment de liaison à AurA est suffisant pour empêcher sa destruction (Giubettini et al. 2011). La liaison de PUM2 (une protéine de liaison à l'ARN) sur la « D-box » entraîne également une stabilisation d'AurA et une augmentation de son activité kinase *in vitro* (Huang et al. 2011). La protéine UPS2a, membre de la famille des « ubiquitin spécifique cysteine protease » (une dés-ubiquitinyllase, DUB), régule la stabilité d'AurA en la dés-ubiquitinyllant. La baisse du niveau d'UPS2a par ARN interférence (ARNi) entraîne une baisse du niveau d'AurA (Shi et al. 2011). La surexpression de « IQ motif containing GTPase activating protein 1 » (IQGAP1), une protéine d'échafaudage et partenaire d'AurA, est capable de stabiliser la kinase au contraire de sa déplétion qui entraîne sa dégradation (Yin et al. 2012). Enfin, le partenaire d'AurA dans ses fonctions au niveau du cil, NEDD9 (présenté partie II.D.2) joue également un rôle dans la stabilité de la kinase. La liaison de NEDD9 à AurA est importante pour cette tâche et sa perte, dans des cellules du cancer du sein, entraîne une dégradation

d'AurA dépendante du protéasome. Ainsi, La mutation de la S296 de NEDD9 en acide glutamique suffit à rompre la liaison des deux protéines et entraîne la dégradation d'AurA (Ice et al. 2013).

Certaines phosphorylations d'AurA vont en revanche réguler sa dégradation. D'abord, la phosphorylation de la T288 semble, en plus d'activer AurA, réguler sa stabilité et entraîner sa dégradation (sûrement pour éviter une trop forte activité kinase) tout comme la phosphorylation de la S349 (chez le xénope) (Pascreau et al. 2008; Walter et al. 2000).

b. Dégradation indépendante de la voie de l'ubiquitine

Il existe également une voie de dégradation d'AurA indépendante de l'ubiquitine. Cette voie fait intervenir la protéine « AurA interacting protein » (AIP). AIP est capable d'interagir avec AurA *in vivo* et a été, dans un premier temps, montrée comme un régulateur négatif de la kinase. Une expression ectopique d'AIP résulte en une baisse des niveaux d'AurA par une dégradation de manière dépendante de l'APC/C (Kiat, Hui, and Gopalan 2002). Plus tard, il a été mis en évidence que cette dégradation se fait indépendamment de l'ubiquitination d'AurA (Shen Kiat Lim and Gopalan 2007). Ce mécanisme semble passer par « antizyme1 » (Az1), un médiateur de la dégradation indépendante de l'ubiquitine. En effet, la surexpression d'Az1 entraîne une perte d'AurA et les deux protéines peuvent interagir toutes les deux. Par ailleurs, AIP ne semble pas pouvoir induire la dégradation d'AurA sans Az1 (S. K. Lim and Gopalan 2007). Les auteurs proposent que le rôle d'AIP est de servir de catalyseur à la formation du complexe Az1-AurA pour la dégradation de cette dernière. La kinase « glycogène synthase kinase-3 β » (GSK-3 β) participe également à la stabilité d'AurA en interagissant avec AIP. Les trois protéines co-localisent aux pôles du fuseau en début de mitose et la perte de GSK-3 β conduit à une stabilisation et une activation d'AurA en début de mitose. AIP est phosphorylée par GSK-3 β et un mutant d'AIP qui n'est plus capable d'interagir avec GSK-3 β peut se lier et réguler négativement AurA plus efficacement (Fumoto et al. 2008).

Une autre étude vient contredire ce rôle d'AIP dans la dégradation d'AurA. Katayama et collaborateurs ont montré qu'elle serait plutôt impliquée dans la stabilisation de la kinase et non dans sa dégradation. Ils mettent en évidence qu'AIP est phosphorylée par AurA sur la sérine 70 et que cette phosphorylation permet la stabilisation d'AIP. Ils montrent également

que la déplétion d'AIP par ARNi entraîne une baisse d'AurA dans trois lignées cellulaires différentes ainsi qu'un arrêt en G2/M, compatible avec un défaut d'AurA (Katayama et al. 2007).

Une autre protéine semble également impliquée dans la voie de dégradation d'AurA indépendante de l'ubiquitine, « phosphorylates Fas associated factor-1 » (FAF1). AurA est capable de phosphoryler FAF1 sur les S289/291 et la surexpression d'un mutant S289/291D réduit le niveau d'AurA de manière dépendante du protéasome mais indépendante de la voie de l'ubiquitinylation (elle réduit aussi les niveaux d'AurA S51D) (Jang et al. 2008).

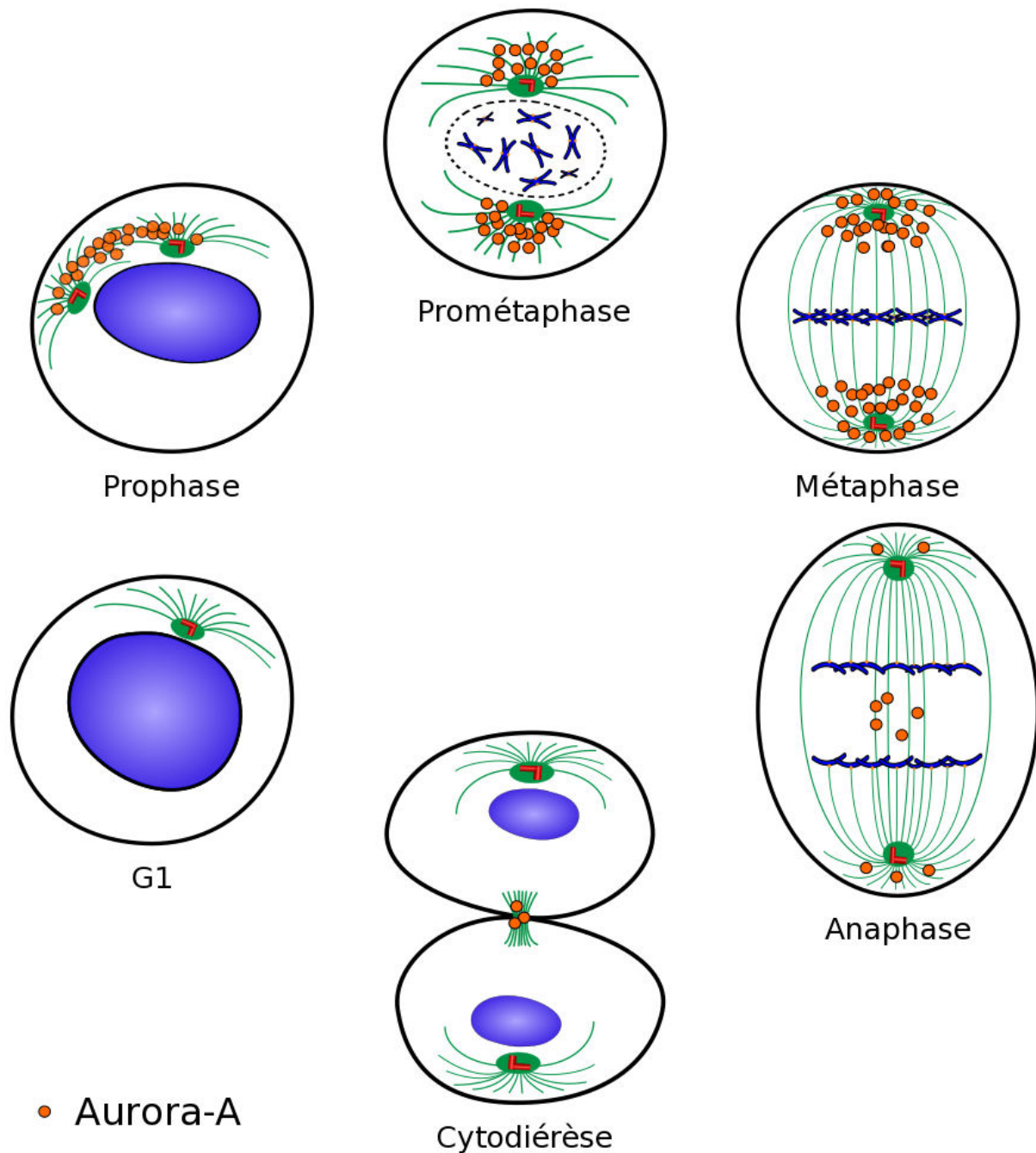


Figure 3 : Localisation d'AurA au cours du cycle cellulaire. En G1, la quantité d'AurA dans la cellule est très réduite. Elle commence à s'enrichir aux centrosomes à l'approche de la mitose en G2/prophase. En prométaphase et en métaphase, AurA est fortement présente au niveau des pôles du fuseau mitotique. En anaphase, le niveau de la kinase commence à décroître et elle est faiblement associée aux centrosomes ainsi qu'au fuseau central. En cytotdiérèse, elle ne se localise plus qu'au « mid-boddy ». Inspiré de (Carmena and Earnshaw 2003).

C. Les rôles d'AurA en mitose

Au cours de la mitose, AurA se localise à différents endroits de la cellule où elle joue des rôles bien particuliers (Figure 3). Elle est présente au centrosome où elle va participer aux mécanismes de maturation et de séparation mais également réguler l'entrée en mitose. AurA est également retrouvée sur les Mt du fuseau où elle participe à la mise en place de cette structure mitotique.

1. Les activateurs d'AurA pour ses fonctions aux centrosomes

A l'aide d'un crible par double hybride, Ajuba a été identifiée comme un partenaire d'AurA puis comme un substrat. Les deux protéines sont localisées aux centrosomes dans les cellules HeLa en phase G2/M du cycle cellulaire et Ajuba est capable d'induire l'autophosphorylation d'AurA et son activation par interaction physique (Hirota et al. 2003) (voir partie II.B.2.d). Ces observations laissent penser que Ajuba est un activateur essentiel d'AurA. La régulation de cette interaction est mal connue mais semble faire participer la kinase « large tumor suppressor kinase 2 » (Lats2). Lats2, une sérine/thréonine kinase, est phosphorylée par AurA sur la sérine S83 et cela est nécessaire à sa localisation au centrosome (Toji et al. 2004). Par ailleurs, Lats2 est capable de phosphoryler Ajuba au centrosome et il est intéressant de noter que la déplétion de Lats2, ou d'Ajuba, entraîne une perte du recrutement de la γ -tubuline (γ -tub) au centrosome (qui est régulée par AurA) (Abe et al. 2006). Cela laisse donc penser qu'il pourrait exister une boucle de régulation entre Lats2, Ajuba et AurA. Cependant, chez la drosophile, et plus particulièrement dans les cellules souches neurales, les neuroblastes (Nb), bien que la perte de l'homologue d'Ajuba entraîne les mêmes défauts de séparation des centrosomes et de fuseaux mal formés que dans le mutant *aurA*, elle n'entraîne pas de défauts d'activation de la kinase au centrosome mais plutôt un défaut du maintien de cette dernière (Sabino, Brown, and Basto 2011). De même, dans cette étude, les auteurs ne parviennent pas à mettre en évidence une interaction directe des deux protéines. Donc chez la drosophile, Ajuba semble requise pour maintenir AurA au pôle mais pas pour l'activer.

Bora, une protéine nucléaire relocalisée dans le cytoplasme en début mitose, a été identifiée chez la drosophile comme un activateur important d'AurA. Bora (drosophile et humaine) est capable de lier et d'activer AurA *in vitro*. En interphase, c'est une protéine

nucléaire qui est relocalisée dans le cytoplasme en mitose sous l'effet de Cdk1 où elle peut alors activer cette kinase (Hutterer et al. 2006). La déplétion de la forme humaine de Bora entraîne le sur-recrutement d'AurA et TPX2 sur le fuseau, ce qui entraîne des problèmes dans sa formation (Chan et al. 2008). Bora est à cette date, le seul activateur connu d'AurA chez la drosophile. Bora est régulée par Plk1 qui entraîne sa destruction par phosphorylation d'un site reconnu par une ubiquitine ligase ($SCF^{\beta-TrCP}$) qui va ubiquitinyler Bora et l'adresser au protéasome. La liaison de Plk1 à Bora nécessite la phosphorylation de la S252 par Cdk1. Par ailleurs, la déplétion de Plk1 entraîne une accumulation de Bora, une mauvaise localisation d'AurA et un défaut dans la maturation des centrosomes (Chan et al. 2008; De Luca, Lavia, and Guarguaglini 2006). Plk1 est donc capable de contrôler les niveaux d'AurA *via* Bora (Chan et al. 2008). Le lien entre les trois protéines et son importance pour l'entrée en mitose est détaillé en partie II.C.2.c.

NEDD9/HEF1, une protéine qui joue un rôle dans l'attachement dépendant des intégrines au niveau des points d'adhésion focaux est également un activateur d'AurA au niveau des centrosomes (Pugacheva and Golemis 2005). « Human enhancer of filamentation 1 » (HEF1) n'est pas nécessaire à la localisation de la kinase mais l'est pour son activation. Ainsi la forme d'HEF1 non phosphorylée s'associe directement avec AurA (mis en évidence par co-immunoprécipitation (co-IP) et GST-Pull Down) ce qui aura pour effet d'activer la kinase. Dans cette étude, les auteurs ont montré que la surexpression de HEF1 a pour effet de sur-activer AurA contrairement à la déplétion de HEF1 qui a l'effet inverse. Ils montrent également qu'AurA interagit d'abord avec une forme non phosphorylée de HEF1 pour son activation, puis va ensuite la phosphoryler ce qui va avoir pour effet la dissociation du complexe.

La forme active de la kinase « p21-activated kinase 1 » (PAK1) est capable de se lier à AurA non activée et de l'activer par phosphorylation sur les résidus T288 et S342 (Zhao et al. 2005). Ces deux sites de phosphorylation avaient déjà été mis en évidence chez le xénope comme étant importants pour l'activité d'AurA (Littlepage et al. 2002) mais le travail de Zhao et collègues montre pour la première fois un rôle de l'état de phosphorylation de la Sérine S342 chez les mammifères. Un mutant pour lequel cette sérine est modifiée en alanine présente une activité kinase plus faible qu'une version sauvage d'AurA. Par ailleurs, il est aussi intéressant de noter qu'une sur-activation de PAK1 entraîne une sur-activation d'AurA dans toute la cellule et non juste au centrosome.

Un autre mécanisme d'activation d'AurA démontré récemment implique une autre protéine centrosomale, la nucléophosmine (NPM) (Reboutier et al. 2012). Les auteurs ont observé que la liaison de la NPM avec AurA entraîne son activation par un mécanisme indépendant de la phosphorylation de la T288, comme cela était précédemment décrit pour les autres activateurs d'AurA (TPX2 ou PAK1). A l'aide d'une analyse protéomique, Reboutier et collaborateurs ont mis en évidence que la liaison de la NPM à AurA entraîne l'autophosphorylation de cette dernière sur le résidu S89. *In vivo*, la mutation de ce dernier compromet l'activité de la kinase au centrosome (Reboutier et al. 2012).

« Anti-actin-related protein 2/3 complex subunit 1b » (Arpc1b), une protéine du complexe régulateur de l'actine « anti-actin-related protein 2/3 » (Arp2/3), est également un activateur d'AurA. Arpc1b est capable de se lier *in vitro* à AurA et d'améliorer son activité kinase. De plus, la déplétion d'Arpc1b empêche l'activation d'AurA au centrosome (Molli et al. 2010). « cullin 3 » (CUL3), un membre de la famille des « cullin-RING » ubiquitine-ligases, et son cofacteur « kelch like family member 18 » (KLHL18) jouent aussi un rôle dans l'activation d'AurA au centrosome et lors de l'entrée en mitose. AurA interagit avec KLHL18 et le complexe CUL3-KLHL18 est capable d'ubiquitinyler la kinase *in vivo* et *in vitro*. Les auteurs ont montré que cette ubiquitinylation est nécessaire pour l'activation d'AurA (Moghe et al. 2012). Mio est un membre très conservé du complexe « Seh1 associated complex activates TORC1 / GTPase-activating protein toward Rags 2 » (SEACAT/GATOR2) nécessaire pour l'activation de la kinase « mammalian target of rapamycin complex 1 » (mTORC1). Elle joue aussi un rôle dans la formation du fuseau et la ségrégation des chromosomes en régulant la concentration des kinases Plk1 et AurA actives au centrosome. Les cellules déplétées en Mio montrent une réduction de l'activation des kinases ainsi qu'une mauvaise localisation de « mitotic centromere-associated kinesin » (MCAK) et « hepatoma up-regulated protein » (HURP) ce qui entraîne des problèmes d'assemblage du fuseau (Platani et al. 2015). Les auteurs suggèrent un rôle important de la voie mTOR dans l'activation d'AurA et Plk1 et la bonne progression mitotique.

Cette liste (non exhaustive) des interacteurs d'AurA démontre le rôle prépondérant des partenaires d'AurA dans le contrôle spatio-temporel de son activité aux centrosomes (Figure 4).

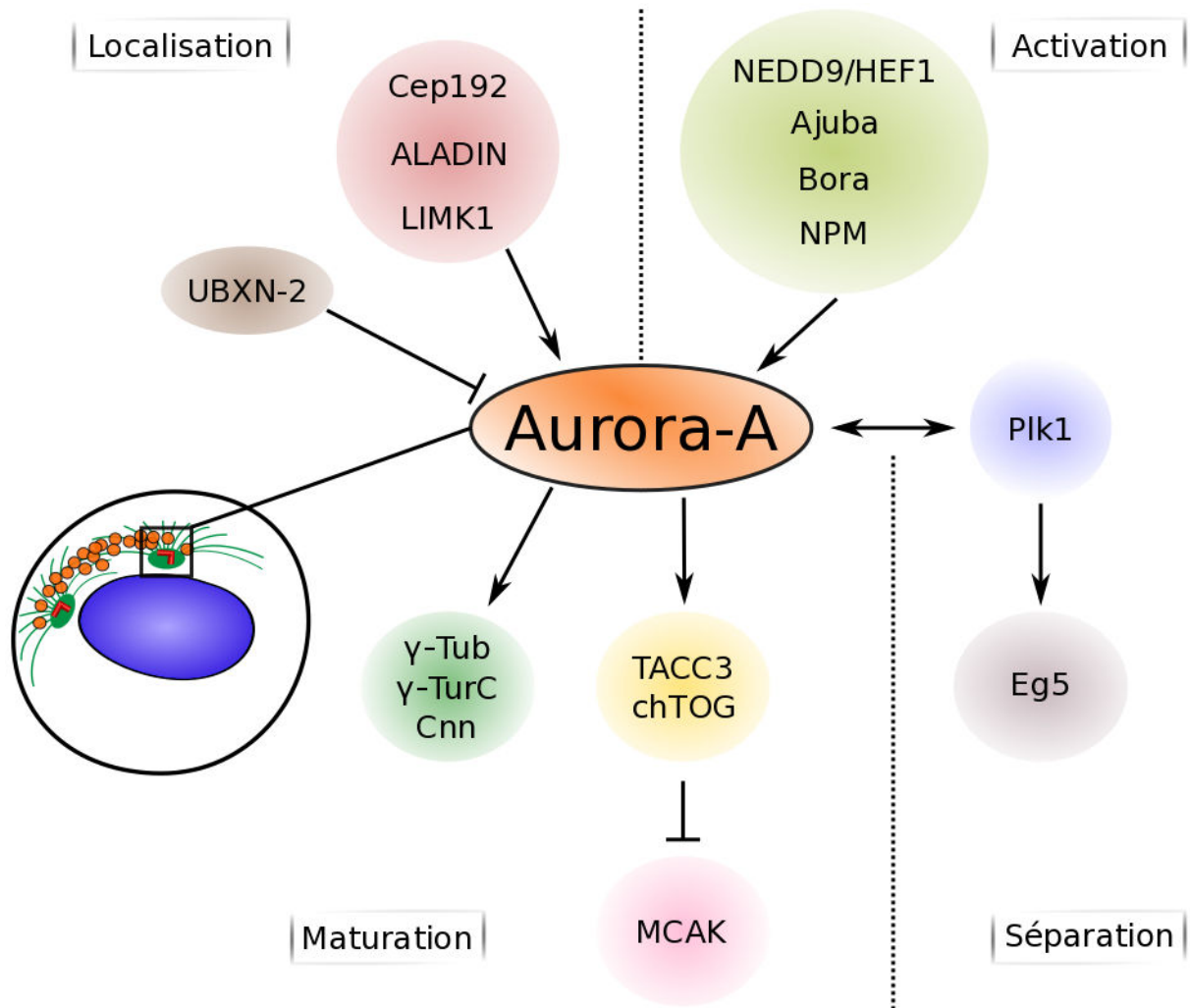


Figure 4 : AurA au centrosome. En G2/prophase, AurA se localise au centrosome où elle interagit avec différents partenaires qui régulent sa localisation et son activation. Elle a également pour rôle de phosphoryler plusieurs substrats impliqués dans les processus de maturation et de séparation des centrosomes.

2. Les fonctions d'AurA au centrosome

AurA a été identifiée au départ comme étant nécessaire à la séparation des centrosomes chez la drosophile (Glover et al. 1995) puis localisée au centrosome mitotique, et plus particulièrement autour du matériel péri-centriolaire (PCM) chez différentes espèces (Bischoff et al. 1998; Giet et al. 2002; Roghi et al. 1998; Schumacher et al. 1998). Cette localisation est régulée au cours du cycle cellulaire (Roghi et al. 1998).

a. Le recrutement d'AurA au centrosome

Le recrutement d'AurA aux centrosomes est assuré par l'interaction avec plusieurs partenaires (Figure 4). Parmi eux se trouve « centrosomal protein of 192 kDa » (Cep192). La perte de Cep192 résulte en une complète perte de fonction des centrosomes en mitose mais pas en interphase. Ces cellules n'arrivent plus à recruter les protéines du PCM comme la γ -tub, la péricentrine ou encore AurA. La surexpression de Cep192 entraîne quant à elle la formation de *foci* contenant la γ -tub et la péricentrine, ce qui lui suggère un rôle d'échafaudage dans la formation du PCM et du fuseau (Gomez-Ferreria et al. 2007). Cep192 va, *via* une interaction directe avec sa partie N-terminale, cibler AurA au centrosome. L'accumulation d'AurA au centrosome va entraîner son homodimerisation/oligomérisation pour permettre potentiellement son activation (Joukov et al. 2010). Ce mécanisme fait également intervenir Plk1 et est dépendant de la péricentrine. Cep192 est aussi capable de recruter Plk1 au centrosome. AurA et Plk1 vont ainsi pouvoir mutuellement s'activer par phosphorylation. Par la suite, la phosphorylation de Cep192 par Plk1 sur de nombreux résidus va former des sites de liaisons pour la γ -tub et possiblement d'autres protéines du PCM (Joukov et al., 2014).

« LIM domain containing protein LIM kinase 1 » (LIMK1) est une sérine/thréonine kinase qui module la dynamique des Mt et de l'actine. LIMK1 joue un rôle important dans la localisation d'AurA aux centrosomes. En effet, AurA interagit physiquement avec LIMK1 et la phosphoryle sur la sérine S307, ce qui entraîne sa localisation au centrosome où elle colocalise avec la γ -tub. LIMK1 est également capable de phosphoryler AurA et cet événement est important pour sa localisation aux pôles et la régulation de la formation du fuseau mitotique (Ritchey et al. 2012).

Une fois localisée aux centrosomes, AurA doit être maintenue dans cette localisation. Par exemple, la protéine de pore nucléaire ALADIN est également un régulateur spatial d'AurA. Sans ALADIN, AurA se propage des pôles vers les Mt du fuseau ce qui a pour conséquence une mauvaise localisation des régulateurs des Mt (HURP et « augmin like complex subunit 6 » (HAUS6)) et une formation du fuseau ralentie. ALADIN interagit avec AurA sous forme inactive et est recrutée aux pôles après l'inhibition d'AurA. ALADIN est essentielle pour la localisation d'AurA (Carvalho et al. 2015).

Le niveau d'accumulation d'AurA au centrosome doit être finement régulé, et une présence d'AurA trop importante peut aussi avoir des effets délétères. « UBX-containing protein in nematodes 2 » (UBXN-2), un adaptateur de substrat de l'AAA ATPase Cdc48/p97, est requis pour la bonne maturation des centrosomes. Sans cette protéine chez *C. elegans*, le recrutement d'AurA au centrosome est augmenté et ces derniers mûrissent précocement en prophase au lieu d'atteindre leur pic de maturation en métaphase. La déplétion d'AurA sauve partiellement les défauts observés. Les observations sont identiques chez l'humain pour lequel la déplétion d'UBXN-2 entraîne une accumulation excessive d'AurA aux centrosomes (Kress et al. 2013).

b. Recrutement de la γ -tub et de la Centrosomine pour la maturation des centrosomes

La maturation des centrosomes est une étape clé afin qu'ils acquièrent le matériel nécessaire pour nucléer des Mt et former un fuseau mitotique. AurA participe à ce mécanisme (Figure 4). Le rôle d'AurA dans ce mécanisme a d'abord été mis en évidence chez *C. elegans* par ARNi contre AurA. La déplétion d'AurA entraîne une perte de 60% de la quantité d' α -tubuline fluorescente au centrosome comparée à une situation contrôle. Les auteurs observent aussi que la kinase est nécessaire pour recruter la γ -tub au centrosome (protéine socle pour la nucléation des Mt) (Hannak et al. 2001). Ce comportement a également été observé chez la drosophile pour laquelle AurA est nécessaire afin de recruter la centrosomine (Cnn) au centrosome et permettre sa maturation dans les cellules souches des organes sensoriels (SOP) (Berdnik and Knoblich 2002). Le recrutement de γ -tub n'est peut-être pas directement dû à AurA. En effet, AurA est capable de se lier avec la Cnn qui elle, lie la γ -tub. Il est donc possible qu'AurA promeut la maturation des centrosomes en recrutant la Cnn qui ensuite

recrute la γ -tub au centrosome ce qui permet la formation des complexes « γ -tubulin ring complex » (γ -TuRC) pour la nucléation des Mt (Terada, Uetake, and Kuriyama 2003).

Les niveaux de γ -tub aux centrosomes sont contrôlés par une ubiquitine ligase, « breast cancer 1 » (BRCA1). AurA phosphoryle BRCA1 et cela a pour effet de réduire son activité E3 ligase et son rôle inhibiteur dans la nucléation des Mt du centrosome (Sankaran et al. 2007). Dans les faits, l'hétérodimère BRCA1-BARD1 (« BRCA1-associated RING domain protein 1 ») se lie et ubiquitinyne la γ -tub afin d'inhiber son pouvoir de nucléation des Mt. La phosphorylation par AurA permet de moduler l'activité de BRCA1 et cela augmente aussi sa rétention au centrosome (Brodie and Henderson 2012).

c. Recrutement de D-TACC/TACC3 et polymérisation des microtubules

En plus de permettre la formation des complexes γ -TuRC, AurA est également impliquée dans le recrutement d'autres facteurs de polymérisation des Mt (Figure 4). Chez la drosophile, AurA permet le recrutement au centrosome d'un de ses substrats, la protéine « drosophila transforming acidic coiled-coil-containing protein » (D-TACC), qui forme un complexe avec la protéine associée aux Mt « mini spindles / xenopus microtubule associated protein 215 kDa » (Msps/Xmap215) (Giet et al. 2002). Msps/Xmap215 a pour rôle de promouvoir l'assemblage et la stabilisation des Mt (Giet et al. 2002). Le recrutement de D-TACC au centrosome passe par la phosphorylation de la protéine « NudE neurodevelopment protein 1 like 1 » (Ndel1) (S251) par AurA. Cette phosphorylation entraîne sa dégradation et la libération de D-TACC qui, quand elle est en complexe avec Ndel1 ne peut être phosphorylée par AurA (Mori et al. 2007). Au cours de la mitose, AurA peut alors phosphoryler D-TACC sur la sérine S863 (S558 chez l'homme) au niveau du centrosome et c'est sous cette forme que D-TACC est capable de recruter Msps, ce qui permettrait la stabilisation des extrémités « minus end » des Mt au centrosome en s'opposant à l'activité déstabilisatrice de la kinésine « mitotic centromere-associated kinesin » (MCAK) (Barros et al. 2005; Kinoshita et al. 2005; LeRoy et al. 2007; Peset et al. 2005).

La régulation du recrutement de Msps semble dépendante d'AurA, indépendamment de D-TACC, tout comme celui de MCAK. La déplétion de la kinase AurA par ARNi en cellule humaine entraîne une mauvaise localisation de « colonic and hepatic tumor overexpressed gene protein » (ch-TOG - l'homologue de Msps) qui s'accumule au pôle et

entraîne la fragmentation de ce dernier. Cela cause également une perte de localisation de MCAK au centrosome (De Luca et al. 2008). Le recrutement de MCAK au pôle (chez le xénope) se fait *via* la phosphorylation de la sérine S719 et son activité semble être contrôlée négativement par la phosphorylation de la S196 *via* AurA et est nécessaire pour le bon regroupement des Mt dans les asters (Zhang, Ems-McClung, and Walczak 2008). AurA régule également la polymérisation des Mt en modulant l'activité d'une autre kinésine déstabilisatrice proche de MCAK avec l'aide de Plk1, « kinesin superfamily protein 2A » (Kif2a) (Jang et al. 2009).

d. La séparation des centrosomes

En 1995, Glover et collaborateurs ont identifié AurA comme étant nécessaire pour la séparation des centrosomes chez la drosophile (Glover et al. 1995). Par la suite, ce rôle majeur a également été décrit chez l'humain (Marumoto et al. 2003). Le premier substrat d'AurA identifié au centrosome est la kinésine 5 / Eg5 (Giet et al. 1999). Eg5 est une kinésine de la famille des BimC qui possède en son domaine C-terminal une partie « Tail » qui contient une thréonine qui est phosphorylée par Cdk1/Cdc2. Cette phosphorylation est nécessaire à la localisation d'Eg5 sur le fuseau mitotique (Sawin and Mitchison 1995). Par ailleurs, plusieurs études ont suggéré un rôle pour cette famille de kinésine dans la séparation des centrosomes (Barr and Gergely 2007). AurA et Eg5 se localisent toutes deux au centrosome de cellule X12 de xénope. De plus, AurA interagit *in vitro* avec Eg5 et est capable de le phosphoryler sur une sérine du domaine « Tail » (Giet et al., 1999). Pourtant, des travaux ont montré que cette phosphorylation n'est pas nécessaire *in vivo* pour ce rôle et que la phosphorylation d'Eg5 par Cdk1 permet le recrutement de suffisamment d'Eg5 sur les Mt et au centrosome (Cahu et al., 2008). Des résultats obtenus récemment chez l'humain (Joukov et al., 2014) sont venus éclairer le mécanisme. Les auteurs montrent que l'activation d'AurA et Plk1 par Cep192 est nécessaire à la séparation des centrosomes *via* la kinésine 5 (Eg5) or, Plk1 est impliquée dans l'activation de Cdk1 (détaillé dans la partie II.C.2.c.). Le rôle majeur d'AurA pourrait donc ici être d'activer Plk1 pour promouvoir la séparation des centrosomes (Figure 4).

e. Les autres substrats d'AurA aux centrosomes

Ski est un régulateur négatif du « transforming growth factor β » (TGF β) et d'autres voies de signalisation. L'absence de Ski entraîne des défauts de ségrégation des chromosomes et de l'instabilité génétique. Ski est phosphorylée par AurA sur les sérines S326 et S383 ce qui a pour conséquence de réduire sa demi-vie. Les deux protéines co-localisent aux centrosomes et sont co-immunoprécipitées. La baisse des niveaux de Ski conduit à une amplification des centrosomes similaire à ce qui est observé après la surexpression d'AurA (Mosquera et al., 2011; Rivas et al., 2016). La protéine « centrosomal P4.1-associated protein - spindle assembly abnormal protein 4 » (CPAP/Sas-4) est requise pour l'élongation des centrioles pendant la phase S/G2. Elle semble également impliquée dans le maintien de l'intégrité des pôles et cela nécessite la phosphorylation par AurA de la sérine S467 en mitose. La déplétion de CPAP/Sas-4 en mitose induit un délai et une dispersion du PCM. Un mutant CPAP/Sas-4 S647D a peu d'affinités pour les Mt mais beaucoup pour le PCM ce qui suggère que la phosphorylation par AurA est essentielle pour le maintien de l'intégrité des pôles et du PCM (Chou et al., 2016). AurA phosphoryle « aster-associated protein » (ASAP - une protéine associée au fuseau) sur la sérine S625 et cette phosphorylation localise ASAP au centrosome de la fin de G2 à la télophase. La déplétion de cette protéine entraîne des problèmes dans la formation du fuseau sauvés par l'expression d'un mutant S625E (Venoux et al., 2008). Lats2 est une kinase qui se localise au centrosome et régule la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. AurA phosphoryle cette kinase sur la sérine S280 au cours de la mitose et cela a pour conséquence de déplacer Lats2 des centrosomes aux chromosomes puis au fuseau central où il co-localise avec AurB. Une interaction existe entre AurA, Lats2, Lats1 et AurB, Lats2 associée à Lats1 au kinétochore (Kt) phosphoryle AurB et un mutant S380A mime un mutant AurB. Il existe donc ici une voie de régulation de la progression en mitose *via* AurA Lats1/2 et AurB (Yabuta et al., 2011)

3. L'entrée en mitose

a. Le recrutement et l'activation de CycB/Cdk1

L'activation d'AurA en fin de G2 est cruciale pour le recrutement du complexe CycB/Cdk1 au centrosome où il est activé pour permettre l'entrée en mitose (Hirota et al., 2003). L'activation de CycB/Cdk1 se fait *via* la phosphorylation activatrice par AurA de Cdc25B sur la sérine S353, une phosphatase activatrice de CycB/Cdk1, (démontré *in vitro* et

in vivo). Cette forme phosphorylée est retrouvée au centrosome et l'inactivation par micro-injection d'anticorps dirigés contre la phospho-Cdc25B bloque l'entrée en mitose (Dutertre et al., 2004). La phosphorylation de la S353 de Cdc25B corrèle avec la relocalisation de la CycB au noyau et l'activation de Cdk1 lors de l'entrée en mitose. En cas d'activation du checkpoint G2/M, Cdc25B n'est plus phosphorylée ; un mutant S353A non phosphorylable permet de passer outre le checkpoint (Cazales et al., 2005). La phosphorylation de Cdc25B par AurA est donc une étape essentielle pour l'entrée en mitose.

b. L'activation de Plk1

La phosphorylation de Plk1 sur la thréonine T210 (dans la boucle d'activation ou « T-loop ») par AurA est nécessaire pour l'entrée en mitose. Cette activité est augmentée par Bora (Macurek et al., 2008; Seki et al., 2008). Bora s'accumule en G2 et entraîne l'activation de Plk1 par AurA, en rendant accessible la « T-loop » de Plk1. Plk1 active va pouvoir, en cascade, activer Cdk1 à l'entrée en mitose (Seki et al., 2008). Plk1 est aussi capable réciproquement de phosphoryler la « T-loop » d'AurA (pendant la maturation des ovocytes de xénopes) (Eckerdt et al., 2009). Il est donc proposé qu'AurA, Plk1 et Cdk1 forment une boucle d'activation pour permettre l'entrée en mitose (Horn et al., 2010). La déplétion des deux kinases semble nécessaire pour perdre l'activation de Cdk1, ce qui indiquerait un rôle partiellement redondant de ces deux kinases dans la régulation de Cdk1. Par ailleurs, une faible activité AurA-Bora au centrosome suffit à maintenir Plk1 actif en mitose (Bruinsma et al., 2014). La protéine Furry semble également impliquée dans ce mécanisme. Furry lie le « polo-box domain » de Plk1 de manière dépendante de la phosphorylation de la T2516 de Furry par Cdk1. Furry lie aussi AurA et facilite ainsi la phosphorylation de la T210 de Plk1 et son activation par AurA (Ikeda et al., 2012).

Ces interactions étroites entre AurA et Plk1 font également intervenir des protéines partenaires. Par exemple, la protéine centrosomale Cep192 lie AurA (voir partie II.C.2.a) mais aussi Plk1 et les cible toutes les deux au centrosome de manière dépendante de la péricentrine. Cela provoque leur activation par phosphorylation réciproque de leur « T-loop » (Joukov et al., 2014). La protéine « peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 » (Pin1) joue également un rôle en régulant la stabilité de BORA, ce cofacteur qui potentialise la phosphorylation de Plk1 par AurA. La liaison de Pin1 sur Bora altère sa translocation dans le cytoplasme et entraîne sa dégradation prématurée par le protéasome. Cette liaison est

supprimée par la phosphorylation de Pin1 par AurA sur la sérine S16 (Lee et al., 2013). Enfin, « Aurora kinase A and ninein interacting protein » (AIBp) interagit avec les deux kinases AurA et Plk1 et promeut leur activation réciproque. Un knockout de cette protéine conduit à des défauts d'activation des deux kinases et entraîne des anomalies en mitose (Chou et al., 2015; Lieu et al., 2010). Les auteurs suggèrent donc qu'AIBp contribue à l'entrée en mitose en participant à l'activation d'AurA et Plk1.

L'ensemble de ces données souligne la corrélation très forte qui existe dans la régulation des activités des kinases AurA et Plk1.

4. La formation d'un fuseau bipolaire

En 1998, Roghi et collaborateurs ont démontré que l'activité kinase d'AurA était requise, chez le xénope, pour former un fuseau bipolaire. Un mutant K196R (domaine kinase inactif) perturbe la formation du fuseau mitotique (Roghi et al., 1998). La kinase est également nécessaire à son maintien car la déplétion d'AurA en métaphase entraîne une perte de bipolarité du fuseau qui devient monopolaire ou multipolaire (Giet and Prigent, 2000). Depuis, de nombreuses protéines associées à AurA et impliquées dans ce mécanisme ont été mises en évidence (Figure 5 et Tableau 1).

a. TPX2

Nous avons vu précédemment que TPX2 est un cofacteur jouant un rôle essentiel dans la régulation de l'activité d'AurA (partie II.B.2.b.). TPX2 joue également un rôle majeur dans la formation du fuseau bipolaire, en localisant AurA sur ce fuseau, ce qui a pour conséquence de stabiliser les Mt qui connectent les Kt aux pôles (De Luca et al., 2006; Özlü et al., 2005). TPX2 a d'abord été identifié comme étant une protéine associée aux Mt et nécessaire pour la formation du fuseau mitotique chez le xénope (Wittmann et al., 2000) et cela de manière dépendante de « ras-related nuclear protein associated with guanosine triphosphate » (RAN-GTP) (Gruss et al., 2001). Les mutants TPX2 présentent des fuseaux plus courts mais bipolaires et ségrégent leurs chromosomes avec des erreurs (Bird and Hyman, 2008; Fu et al., 2015). Cela est probablement dû au fait qu'il n'y a pas de polymérisation de Mt *via* les chromosomes.

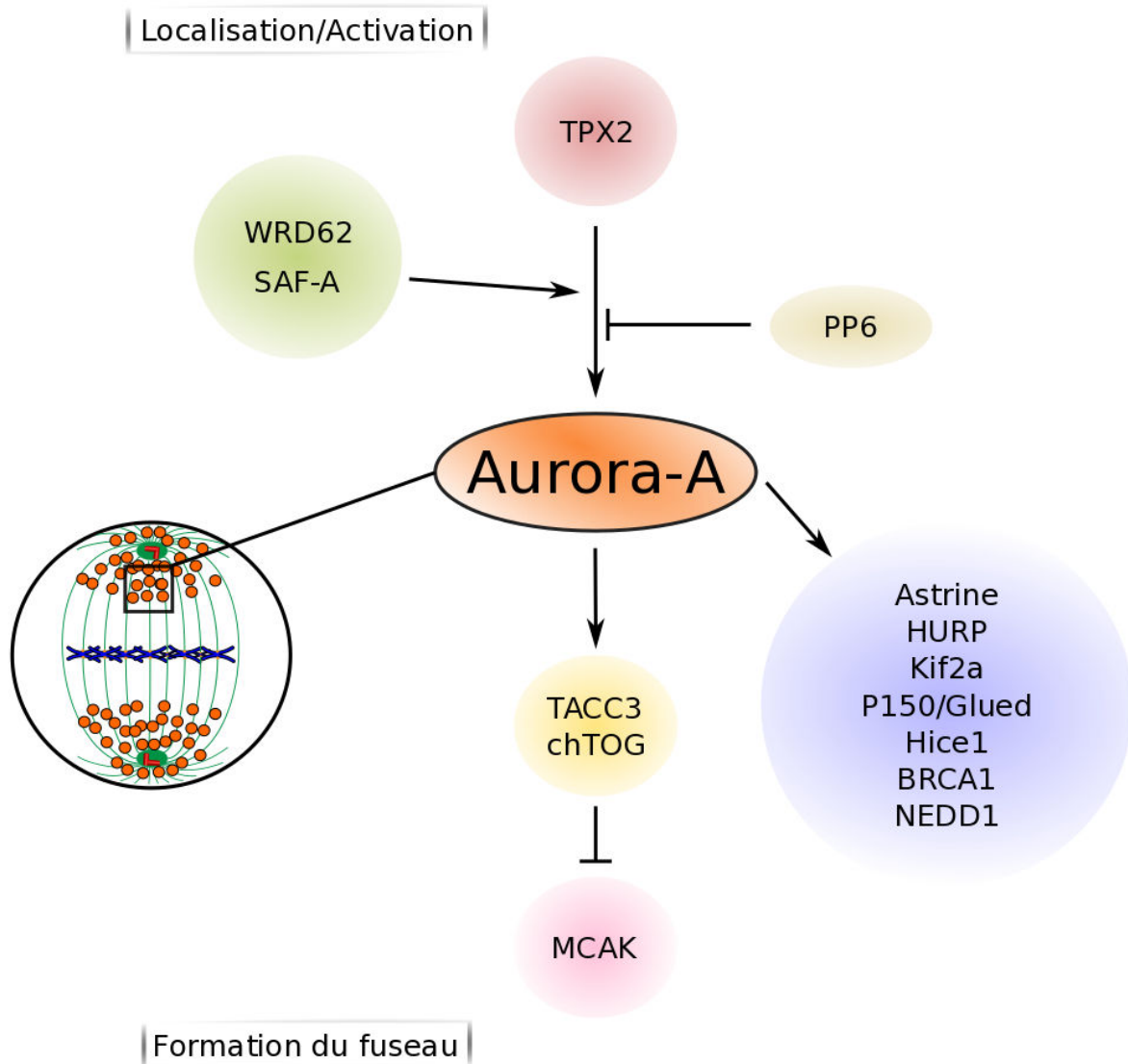


Figure 5 : AurA au fuseau mitotique. A l'entrée en mitose, AurA se localise sur les pôles du fuseau où elle va interagir avec différents partenaires qui vont réguler son activation et sa localisation. Elle va également pouvoir phosphoryler différents substrats impliqués dans la formation du fuseau mitotique.

Normalement, TPX2 participe à la formation des Mt à partir de la chromatine en étant libérée de l'inhibition des importines de façon dépendante du gradient de RAN-GTP qui crée alors un gradient d'AurA activé pour recruter des *foci* de γ -tub et polymériser des Mt (Katayama et al., 2008; Tsai and Zheng, 2005; Tsai et al., 2003). La phosphorylation de la T72 de TPX2 par Cdk1 participe à la régulation de l'activation d'AurA. Elle réduit son affinité pour les Mt du fuseau et contribue à limiter l'activation d'AurA et l'activité de la kinésine 5 (Eg5). Ainsi, un mutant non phosphorylable TPX2 T72A (qui s'accumule sur le fuseau) présente des fuseaux plus longs probablement dus à une augmentation de l'activité d'Eg5 (Shim et al., 2015). La phosphorylation des sérines S121/125 est également importante, cela régule l'interaction de TPX2 avec « cytoplasmic linker associated protein 1 » (CLASP1) et Kif2a pour réguler le flux de Mt dans le fuseau et contribuer au contrôle de sa taille (Fu et al., 2015).

L'importance de l'interaction entre AurA et son partenaire TPX2 est encore mise en évidence dans des études sur « WD40-repeat protein 62 » (WDR62, une protéine retrouvée mutée dans certaine microcéphalie humaine) et « scaffold attachment factor A » (SAF-A ou hnRNP-U), 2 cofacteurs qui sont en complexe avec AurA et TPX2. Les cellules déplétées en WDR62 montrent une instabilité du fuseau ainsi qu'un arrêt en mitose dus à l'activation du SAC. WDR62 interagit avec AurA et TPX2 et permet l'activation d'AurA par TPX2. Les deux protéines se localisent normalement dans un mutant WDR62 mais AurA montre des niveaux d'activation beaucoup plus faibles (Chen et al., 2014). Il existe des boucles de rétrocontrôle positif entre AurA, TPX2 et WDR62 : en effet, AurA phosphoryle WDR62 sur les sérines S32, S33, S49 et la thréonine T50, ce qui contribue à sa localisation et à la formation du fuseau (Lim et al., 2015, 2016).

La protéine SAF-A contribue également à la formation du fuseau en ciblant AurA sur les Mt. SAF-A co-localise et co-immunoprécipite avec AurA et TPX2 et la perte de l'un ou l'autre entraîne un défaut de localisation de SAF-A. La déplétion de SAF-A conduit à un délai en mitose et des défauts d'alignement des chromosomes (Ma et al., 2011).

Pour l'heure, chez la drosophile, aucun vrai homologue de TPX2 n'a été trouvé, seule une protéine partageant une similarité avec le domaine de liaison aux Mt a été identifiée mais elle ne comporte pas de domaine de liaison à AurA et semble n'avoir que peu d'impact sur la division cellulaire (Goshima, 2011).

b. D-TACC/TACC3

Tout comme TPX2, D-TACC dépend pour son activation du gradient de RAN-GTP autour des chromosomes et joue un rôle important dans la formation du fuseau (en plus de son rôle au centrosome). Chez le xénope, les importines β inhibent la phosphorylation de D-TACC (Maskin) par AurA ce qui bloque son action dans la formation du fuseau. A l'entrée en mitose, RAN-GTP va permettre la libération de D-TACC des importines et donc permettre sa phosphorylation par AurA (Albee et al., 2006). Cette phosphorylation permet le recrutement de D-TACC sur le fuseau (phosphorylation de la S558 par AurA) et la formation d'un complexe avec ch-TOG (l'homologue de Msps/XMap215) et la clathrine (Burgess et al., 2015; Cheeseman et al., 2011; Thakur et al., 2014). L'inhibition d'AurA entraîne la perte au niveau du fuseau de ce complexe associée à une déstabilisation des fibres kinétochoriennes et une perte des ponts inter-Mt (Cheeseman et al., 2011). Burgess et collaborateurs proposent que la relation entre AurA et ch-TOG permet la stabilisation des Mt en modifiant l'activité du complexe ch-TOG-TACC3 de la polymérisation des Mt vers leur stabilisation. Ce complexe participe ainsi à la régulation de la longueur, la stabilité et la vitesse de formation du fuseau (Burgess et al., 2015).

c. Les autres facteurs impliqués dans la formation du fuseau

AurA va moduler la formation du fuseau mitotique en phosphorylant de nombreuses protéines impliquées dans la formation et la stabilisation des Mt.

AurA interagit et phosphoryle NEDD1, une protéine adaptatrice du complexe γ -TuRC, sur la sérine S405. Cette phosphorylation est nécessaire pour la nucléation des Mt autour des chromosomes par la voie RAN-GTP. Cette interaction d'AurA est importante pour la formation du fuseau à partir des chromosomes (Pinyol et al., 2013).

« Hec1/Ndc80-interacting centrosome-associated protein 1 » (Hice1), une sous-unité de l'Augmine, est une protéine associée au fuseau qui contribue à la nucléation intra-fuseau des Mt. Elle est régulée par phosphorylation d'AurA sur plusieurs « clusters » de sérine/thréonine. Le plus crucial pour la formation du fuseau est le cluster S/T 17-21. Un mutant S/T17-21E réduit la localisation aux Mt de Hice1 et réduit aussi la localisation du complexe Augmine sur le fuseau. Au contraire, un mutant phosphomimétique présente une nucléation intra-fuseau plus forte et des délais en mitose et dans la séparation des

centrosomes. La phosphorylation d'AurA sur Hice1 permet donc de moduler la polymérisation des Mt intra-fuseau (Tsai et al., 2011).

HURP est une protéine associée au fuseau qui est liée à la formation du fuseau *via* le gradient de RAN-GTP. Sa liaison sur les Mt se fait par sa partie N-terminale et cela permet la stabilisation de ces derniers. La liaison est régulée par la phosphorylation d'AurA sur la partie C-terminale qui ne peut plus lier la partie N-terminale et donc cela lève l'auto-inhibition qui bloquait la liaison avec les Mt (Wong et al., 2008).

AurA interagit et co-localise avec Astrine sur le fuseau mitotique. Astrine est impliquée dans le maintien de la cohésion des chromatides sœurs en inhibant la Séparase et en stabilisant le fuseau. La déplétion d'Astrine abolit la localisation d'AurA au fuseau et entraîne un délai modéré en mitose. En revanche, la déplétion d'AurA n'a pas d'effet sur la localisation d'Astrine (Du et al., 2008). AurA phosphoryle Astrine sur la S115 pour lui permettre de se lier avec ses partenaires « small kinetochore-associated protein » (SKAP-Kinase associée à SRC) et « cytoplasmic linker associated protein 1 alpha » (CLASP-1 α), impliqués dans la formation du fuseau. Un mutant S115D est capable de lier et d'induire la dégradation de la Sécurine par ubiquitinylation et entraîner ainsi une séparation anticipée des chromatides sœurs (Chiu et al., 2014). La phosphorylation de cette protéine par AurA semble donc importante pour la formation du fuseau et la progression en mitose.

La régulation de la formation du fuseau mitotique implique également l'exclusion de certaines protéines du fuseau en formation. AurA, grâce à son activité kinase, va également jouer un rôle essentiel à ce niveau.

Kif2a est une kinésine déstabilisatrice des Mt qui contrôle l'assemblage du fuseau et la « congression » des chromosomes. Elle est régulée positivement par Plk1 (qui augmente son activité dépolymérisante et réduit sa capacité à lier les Mt) et négativement par AurA (qui fait l'inverse). Ce contrôle fin permet de réguler la stabilité des Mt à différents endroits (fuseau et centrosome) (Jang et al., 2009).

P150/Glued, une sous-unité du complexe dynactine est phosphorylée par AurA dans son domaine de liaison aux Mt. La dynactine est fortement accumulée sur les Mt en prophase mais est bloquée dès la rupture de l'enveloppe nucléaire. L'absence d'AurA entraîne un enrichissement de ce complexe aux pôles du fuseau en mitose et des problèmes d'assemblage

du fuseau. Cette phosphorylation de P150 par AurA participe à la formation du fuseau (Romé et al., 2010).

5. Les autres rôles

a. Au kinétochore

AurA semble également jouer un rôle dans la régulation des attachements microtubules-kinétochores (Mt-Kt). Il a été observé une interaction entre AurA et la protéine centrosomale CENP-A. AurA phosphoryle CENP-A (S7) en prophase et cela est nécessaire pour la phosphorylation de CENP-A par AurB et la restriction d'AurB au centromère en prométaphase (Kunitoku et al., 2003). La non phosphorylation de CENP-A résulte en un mauvais alignement des chromosomes et un défaut de la liaison des Mt-Kt.

AurA est capable de phosphoryler directement Ndc80, une protéine du kinétochore impliquée dans la stabilisation et la correction des attachements Mt-Kt. La phosphorylation de Ndc80 réduit son affinité pour les Mt. Un gradient d'activité d'AurA pourrait donc contribuer à la correction des erreurs d'attachements en déstabilisant les attachements Mt- Kt à proximité des pôles du fuseau (Chmátal et al., 2015; Ye et al., 2015a).

b. Le point de contrôle d'assemblage du fuseau

Un potentiel rôle d'AurA dans le SAC, checkpoint impliqué dans la surveillance des attachements Mt-Kt et qui retarde l'anaphase jusqu'à ce que tous les attachements ne sont pas corrects, a été évoqué en 1999. Une étude a montré qu'AurA s'associe avec Cdc20, un cofacteur requis pour l'activation de l'APC/C et séquestré dans le complexe « mitosis checkpoint complex » (MCC) jusqu'à ce que tous les attachements Mt-Kt ne sont pas corrects (détaillé au chapitre suivant). Les résultats obtenus suggèrent qu'AurA pourrait phosphoryler Cdc20, ou du moins, que l'association des deux protéines pourrait jouer un rôle dans la régulation des fonctions de Cdc20 (Farruggio et al., 1999). De même, AurA est capable de phosphoryler « RAS-association domain family 1 isoform A » (RASSF1A), un suppresseur de tumeur qui lie et stabilise les Mt et induit un arrêt en phase M *via* une action sur l'APC/C. AurA le phosphoryle durant la mitose sur les résidus T202/S203 dans le domaine de liaison aux Mt. Cela abolit son interaction avec les Mt et sa capacité à arrêter les cellules en phase M.

Une forme phosphomimétique de RASSF1A sur la S203A entraîne des problèmes de dissociation de RASSF1A avec Cdc20 et donc un défaut d'activation de l'APC/C (Rong et al., 2007; Song et al., 2009). De manière intéressante, RASSF1A semble être aussi un activateur de la kinase. En effet, lorsqu'il est surexprimé, il inhibe la séparation des centrosomes et lorsqu'il est déplété, il entraîne une baisse de l'activité d'AurA. *In vitro*, RASSF1A n'est pas capable d'activer directement la kinase et c'est pourquoi les auteurs lui confèrent plus un rôle d'échafaudage pour l'activation d'AurA (Liu et al., 2008).

Il a été mis en évidence que la surexpression d'AurA permet de passer outre le SAC quand les cellules sont traitées au taxol ou au nocodazole (Anand et al., 2003; Jiang et al., 2003). Quand les cellules sont traitées au taxol en présence d'une surexpression d'AurA, ces dernières rentrent en anaphase malgré des fuseaux mal formés et une persistance de la protéine « mitotic arrest deficient 2 » (Mad2) aux Kt. A cela s'ajoutent des défauts de cytokinèse et une multi-nucléation des cellules (Anand et al., 2003). La surexpression d'AurA semble perturber l'assemblage du MCC, et particulièrement le complexe Cdc20-BubR1 « Bub1-related protein 1 », ce qui entraîne une inactivation du SAC. L'activité kinase de BubR1 déplace AurA de Cdc20 (Jiang et al., 2003).

Le rôle d'AurA dans la régulation du SAC reste cependant ambigu. En effet, des travaux plus récents ont mis en évidence que l'activité d'AurA peut également être nécessaire pour maintenir le délai en mitose suite à l'ajout de drogues perturbatrices du fuseau. L'inhibition d'AurA conjuguée à l'utilisation de taxol ou de nocodazole conduit à l'apparition de cellules multi-nucléées après une sortie de mitose accélérée avec persistance de BubR1 aux Kt (Wysong et al., 2009).

En accord avec ces derniers résultats, la phosphorylation de p73, un membre de la famille p53 considéré comme un suppresseur de tumeur, sur la S235 par AurA empêche sa transactivation et cause sa rétention dans le cytoplasme dans un complexe avec la protéine chaperonne mortaline. Cela facilite aussi l'inactivation du SAC *via* la dissociation du complexe Cdc20-Mad2 (pré-MCC). Des mutants S235D présentent des propriétés de croissance altérée, une dissociation de Cdc20-Mad2 prématurée et une sortie de mitose accélérée avec dépassement du SAC en présence de dommages au fuseau (Katayama et al., 2012).

c. La cytokinèse

Très peu de chose sont connues sur le rôle de la kinase AurA à ce moment de la mitose à cause de ses fonctions en début de mitose qui perturbent l'analyse à ce stade. Une étude a montré qu'AurA est requise pour la formation du fuseau central en anaphase *via* la phosphorylation de D-TACC sur la sérine S558 (Lioutas and Vernos, 2013). Par ailleurs, en utilisant une version de la kinase inactivable rapidement par un analogue de l'ATP, le 1-Na-PP1, Rebutier et collaborateurs ont également montré l'implication d'AurA dans la formation du fuseau central, cette fois en phosphorylant la sérine S19 de P150/Glued (Rebutier et al., 2013).

D. Les autres rôles d'AurA

1. Etablissement de la polarité cellulaire et orientation du fuseau

Chez la drosophile, un mutant AurA présente une mauvaise localisation de Numb, un déterminant d'identité cellulaire qui normalement se situe au cortex antérieur des cellules souches SOP. Cela entraîne un défaut de signalisation Notch dans la progénie et un problème de différenciation cellulaire (Berdnik and Knoblich, 2002). C'est également le cas dans les Nb où la perte d'AurA entraîne un défaut de la localisation d'« atypical protein kinase C » (aPKC) et de Numb ainsi qu'une mauvaise orientation du fuseau. La mauvaise localisation de Numb entraîne une sur-activation de Notch dans les cerveaux qui empêche la différenciation cellulaire (Lee et al., 2006a; Wang et al., 2006). AurA influe sur la localisation d'aPKC et Numb par une cascade de phosphorylation. Ainsi, AurA phosphoryle « partitioning defective 6 » (PAR-6) qui régule aPKC et l'active, entraînant la phosphorylation de « lethal(2) giant larvae protein » (Lgl) (qui lie et inhibe aPKC en interphase). Lgl phosphorylée est retirée du complexe et permet l'entrée de PAR-3 (Bazooka). Cela entraîne le changement de spécificité de substrat d'aPKC qui peut alors phosphoryler Numb et l'exclure du cortex où aPKC est présent (apical) (Wirtz-Peitz et al., 2008). Dans les cellules neuronales de rat, AurA semble agir directement sur aPKC en phosphorylant son domaine de liaison à PAR-3 sur la Sérine S962 (Khazaei and Püschel, 2009).

AurA joue également un rôle dans l'orientation du fuseau. La protéine Lgl doit se relocaliser du cortex au cytoplasme en début de mitose pour permettre la bonne orientation du fuseau. Il a été montré que aPKC est requise pour la localisation polarisée de Lgl alors qu'une phosphorylation par AurA sur les sérines S656 et S664 de Lgl, dans le site de phosphorylation

putatif par aPKC, le retire complètement de la membrane en mitose dans les cellules épithéliales. Ce retrait est proposé par les auteurs comme nécessaire pour que Lgl quitte son partenaire « discs large » (Dlg) et que ce dernier puisse interagir avec « partner of inscuteable » (Pins) pour permettre l'orientation du fuseau dans le plan dans les cellules épithéliales (Bell et al., 2015; Carvalho et al., 2015). AurA serait également requise pour localiser Dlg correctement *via* une phosphorylation de Pins (Johnston et al., 2009).

Enfin, AurA contribue à l'orientation du fuseau en contrôlant le ciblage cortical de « nuclear mitotic apparatus protein / mushroom body defect » (NuMA/Mud). NuMA/Mud est normalement associée avec ses partenaires « G protein α i subunit) (Gai) et Pins et s'accumule au niveau du cortex, aux 2 pôles de la cellule. Ce complexe est essentiel pour recruter le moteur moléculaire dynéine qui va agir sur les microtubules astraux, permettant ainsi la mise sous tension de ces microtubules et moduler l'orientation du fuseau. La suppression d'AurA entraîne une accumulation de NuMA/Mud et de la Dynéine aux pôles qui ne sont plus dirigés vers le cortex. AurA phosphoryle NuMA/Mud sur trois sérines, dont la S1969, qui semblent cruciales pour sa dynamique et sa fonction dans l'orientation du fuseau. Cette phosphorylation directe de NuMA/Mud par AurA contrôle sa mobilité et son enrichissement cortical (Gallini et al., 2016).

2. Le désassemblage du cil

Le cil est une plateforme qui sert à la signalisation cellulaire en interphase. Il a été récemment découvert un rôle pour AurA dans le contrôle de son désassemblage. Au corps basal du cil, AurA interagit avec HEF1-Cas1/NEDD9 (complexe requis pour l'activation de la kinase en mitose) et entraîne la phosphorylation de « histone deacetylase 6 » (HDAC6), une tubuline désacétylase, ce qui conduit au désassemblage du cil. Cette voie semble être nécessaire et suffisante (Pugacheva et al., 2007). L'interaction entre AurA et NEDD9 se fait *via* une signalisation calcique et la Calmoduline (Plotnikova et al., 2012). Le récepteur au « platelet-derived growth factor » (PDGF), PDGFR β , est impliqué dans la déciliation par le relargage de Ca²⁺ médié par la « phospholipase C γ » (PLC γ) qui va activer AurA (Nielsen et al., 2015).

3. Interaction avec p53

AurA est un partenaire de p53 (confirmé par co-IP et GST-Pull-Down). p53 est capable de supprimer l'amplification des centrosomes (ou de l'augmenter quand il est absent) et semble également capable de contrôler la capacité d'AurA à transformer des cellules car la perte de p53 entraîne une sur-activation d'AurA. Cela passe par le fait que p53 inhibe l'activité kinase d'AurA par interaction directe et donc, en son absence (cancer) il n'y a plus d'inhibition d'AurA (Chen et al., 2002; Evers and Maller, 2004; Meraldi et al., 2002). p53 est aussi capable de contrôler AurA par la voie transcriptionnelle. En effet, il a été démontré que la perte de p53 entraîne une élévation de p21, ce qui augmente l'activité de Cdk2, suivi par une hyperactivation de « retinoblastoma protein » (Rb1) et sa dissociation du facteur E2F3, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'expression d'AurA (Wu et al., 2012). p53 contrôle également le renouvellement d'AurA : une déplétion de p53 entraîne une sous régulation de « F-box/WD repeat-containing protein 7 » (FBW7 α), une ubiquitine E3 ligase d'AurA, ce qui cause un défaut de dégradation d'AurA (Wu et al., 2012).

AurA est également capable de réguler p53. Elle la phosphoryle sur la sérine S215 ce qui abroge ses capacités à lier l'ADN et sa trans-activation (Liu et al., 2004). La phosphorylation de la sérine S106 entraîne une perte d'affinité pour la protéine MDM2 et prolonge la demi-vie de p53 (Hsueh et al., 2013). Enfin, AurA phosphoryle « Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K » (hnRNPK), un co-activateur transcriptionnel de p53, sur la S379 et cela rompt leur liaison (Hsueh et al., 2011).

4. Rôles divers d'AurA

Depuis quelques années, de très nombreuses publications viennent garnir les différentes fonctions de la kinase. On peut citer par exemple un rôle dans la réplication de l'ADN (Tsunematsu et al., 2015), dans l'apoptose (Moustafa-Kamal et al., 2013), dans le fractionnement de l'appareil de golgi en G2 (Persico et al., 2010), dans l'élongation des neurites (Mori et al., 2009), dans la voie « nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells » (NF κ B) (Briassouli et al., 2007), dans la migration cellulaire (Lim et al., 2010), la fission des mitochondries (Kashatus et al., 2011) ou encore sur le cytosquelette d'actine (Moon and Matsuzaki, 2013). Tout cela démontre une importance d'AurA au cours du cycle cellulaire et plus majoritairement de la vie de la cellule.

E. AurA dans les cancers

AurA est souvent retrouvée comme étant surexprimée dans de nombreux cancers (sein, colon, ovaire, prostate) notamment à cause de l'amplification de la région chromosomique 20q13, comprenant le gène AurA (Baba et al., 2009; Bischoff et al., 1998; Giet and Prigent, 1999; Hu et al., 2005; Zhou et al., 1998). La surexpression de la kinase perturbe de nombreux processus, comme nous avons pu le voir dans ce chapitre, entraînant une amplification des centrosomes, de l'aneuploïdie et une instabilité génétique (Meraldi et al., 2002; Zhou et al., 1998). Ces observations ont conduit à envisager AurA comme une cible thérapeutique anticancéreuse avec le développement d'au moins 13 inhibiteurs d'AurA différents évalués en phase I chez des patients présentant des tumeurs solides ou hématopoïétiques. Dû à une toxicité ou un manque d'efficacité, seulement peu d'entre eux ont atteint la phase II et seul l'alisertib (MLN8237) est allé en phase III (D'Assoro et al., 2016; Dominguez-Brauer et al., 2015). Cet inhibiteur montre déjà des effets encourageants sur les cancers du sein et du poumon chez des patients dans une étude de phase II (Melichar et al., 2015) et des effets modestes contre la leucémie aiguë myéloblastique, toujours dans une étude de phase II (Goldberg et al., 2014).

Cependant, il faut rester prudent quant à l'utilisation de ces inhibiteurs aux vues du nombre de mécanismes (mitotiques ou non) dans lesquels AurA est impliquée et des possibles effets secondaires indésirables comme la génération d'une faible aneuploïdie dans des cellules saines et l'apparition de tumorigénèse secondaire par exemple. De plus, AurA possède également un rôle de suppresseur de tumeur dans le contexte particulier du Nb de drosophile : AurA y est requise pour l'établissement de la polarité et l'orientation du fuseau. Dans les mutants d'AurA, les défauts de divisions asymétriques entraînent une surprolifération des Nb et la formation de tumeurs (présenté partie IV). Une meilleure compréhension du rôle et des fonctions d'AurA est donc nécessaire pour permettre l'utilisation et le développement de médicaments à base d'inhibiteur d'AurA dans les traitements anticancéreux en toute sécurité pour les patients.

Tableau 1 : les interacteurs d'AurA et leur fonction

	Protéine	Localisation	Fonction
Activateurs	TPX2	Pôle du fuseau	Activation, ciblage aux Mt
	Ajuba	Centrosome	Activation
	Bora	Cytoplasme	Activation
	NEDD9	Centrosome	Activation
	Ca ²⁺ /Calmoduline	Centrosome	Activation rapide
	NPM	Centrosome	Activation
	I-2	Centrosome	Activation
	Arpc1b	Centrosome	Activation
	PAK1	Centrosome	Activation
	KLHL18	Centrosome	Activation
	Mio	Centrosome / Fuseau	Activation
	AIBp	Centrosome	Activation
Inhibiteurs			
	PP1		Inactivation
	PP2A	Pôle du fuseau	Dégradation
	PP6	Pôle du fuseau	Inactivation
	p53		inhibition
Substrats/partenaire			
	LIMK2		Activation d'AurA
	HDAC6	Cil primaire	Désassemblage du cil primaire
	Ndc80	Kinétochore	Déstabilisation des attachements Mt-Kt
	Cdc25B	Centrosome	Entrée en mitose
	Ski	Centrosome	Formation des centrosomes
	P150glued	Fuseau mitotique	Formation des fuseaux mitotique et central
	Astrine	Fuseau mitotique	Formation du fuseau
	TACC3	Centrosome / Fuseau	Formation du fuseau mitotique
	Ndel1	Centrosome	Formation du fuseau mitotique
	HURP	Fuseau mitotique	Formation du fuseau mitotique
	ASAP	Centrosome	Formation du fuseau mitotique
	WDR62	Pôle du fuseau	Formation du fuseau mitotique
	SAF-A	Pôle du fuseau	Formation du fuseau mitotique
	NEDD1	Pôle du fuseau	Formation du fuseau mitotique
	Hice1	Fuseau mitotique	Formation du fuseau mitotique
	LIMK1	Centrosome	Localisation d'AurA au centrosome

Tableau 1 : suite

	ALADIN	Centrosome	Maintien de la localisation d'AurA
	CPAP/Sas-4	Centrosome	Maintien du PCM
	BRCA1	Centrosome	Maturation des centrosomes
	Lats2	Centrosome	Maturation des centrosomes
	Cep192	Centrosome	Maturation des centrosomes
	Centrosomine	Centrosome	Maturation des centrosomes
	Plk1	Cytoplasme	Maturation des centrosomes, Entrée en mitose
	PAR-6	Cortex cellulaire	Mise en place de la polarité
	Lgl	Cortex cellulaire	Mise en place de la polarité
	NuMA/Mud	Pôle du fuseau	Orientation du fuseau
	CENP-A	Centrosome	Régulation des Mt-Kt
	UBXN-2	Centrosome	Régulation du niveau d'AurA au centrosome
	RASSF1A	Fuseau mitotique	Régulation du SAC
	p73	Cytoplasme/Noyau	Régulation du SAC
	Eg5	centrosome	Séparation des centrosomes
	p53	Noyau	Transcription
Destruction	Cdh1		Dégradation protéosomale Ub-dépendante
	Chfr		Dégradation protéosomale Ub-dépendante
	PP2A	Pôle du fuseau	Dégradation protéosomale Ub-dépendante
	AIP		Dégradation protéosomale Ub-indépendante
	Az1		Dégradation protéosomale Ub-indépendante
	GSK-3 β		Dégradation protéosomale Ub-dépendante
	FBXW7	Pôle du fuseau	Dégradation protéosomale Ub-dépendante
	FAF1		Dégradation protéosomale Ub-dépendante
	USP2a		Protège de la dégradation
	PUM2		Protège de la dégradation

III. Le point de contrôle d'attachement du fuseau et la ségrégation des chromosomes

A. Le point de contrôle d'attachement du fuseau

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la dérégulation d'AurA entraîne des défauts d'assemblage du fuseau mitotique. Ces défauts peuvent conduire à l'apparition d'erreurs de ségrégation des chromosomes et à la perte d'information génétique ou à de l'aneuploïdie, un marqueur couramment retrouvé dans les cancers. Pour réduire au maximum ce risque, il existe un point de contrôle d'assemblage du fuseau (SAC) capable de surveiller le bon attachement des microtubules aux kinétochores des chromosomes (Mt-Kt) (Rieder et al., 1994, 1995). Son rôle est de bloquer la progression en métaphase et l'initiation de l'anaphase tant que tous les Kt ne sont pas correctement attachés. Un seul mauvais ou non-attachement est capable d'être détecté par le SAC et donc de retarder la sortie de mitose (Rieder et al., 1995). De très nombreuses protéines sont aujourd'hui identifiées comme appartenant à la signalisation de ce point de contrôle mais les mécanismes moléculaires exacts qui modulent l'activité du SAC avec la détection de l'attachement des Mt aux Kt n'est pas encore complètement défini.

1. La mise en place du SAC

Les premières protéines impliquées dans le SAC ont été mises en évidence chez la levure *S. cerevisiae* par des cribles pour identifier des gènes nécessaires à l'arrêt en mitose suite à une perturbation du fuseau mitotique, il s'agit des protéines de la famille « budding uninhibited by benzimidazole » (Bub) Bub1 et Bub3 (Hoyt et al., 1991) et celles de la famille des « mitosis arrest deficient » (Mad) Mad1, Mad2 et Mad3 (appelée BubR1 chez l'humain) (Li and Murray, 1991). La kinase « monopolar spindle 1 » (Mps1) a également été identifiée comme nécessaire à l'arrêt en mitose suite à un traitement au nocodazole (Hardwick et al., 1996; Weiss and Winey, 1996). Par la suite de très nombreuses études se sont intéressées à la dynamique de la mise en place du SAC.

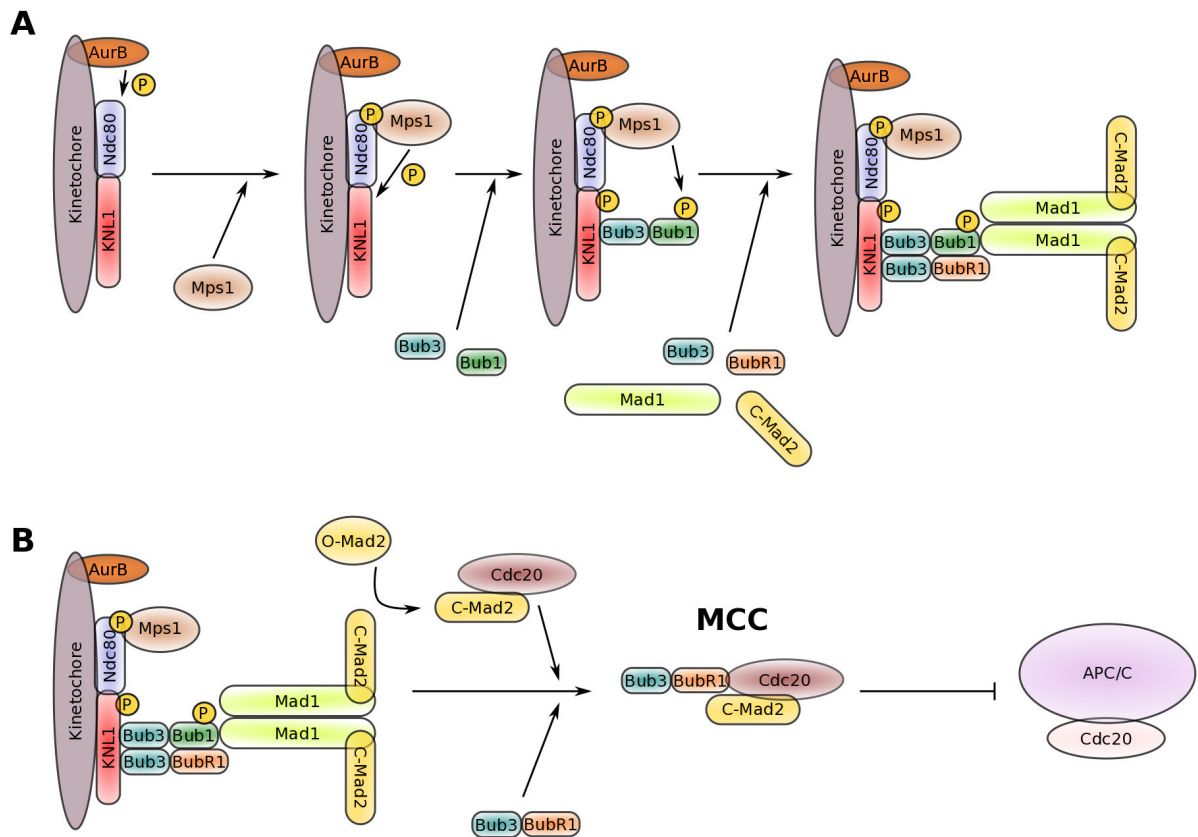


Figure 6 : La mise en place séquentielle du point de contrôle d'assemblage du fuseau et du signal inhibiteur de l'anaphase. (A) Au Kt non attaché, la phosphorylation de Ndc80 par AurB va permettre le recrutement de la kinase Mps1. Mps1 va ensuite phosphoryler les répétitions MELT de KNL1 ce qui va permettre le recrutement de Bub1 et Bub3. Bub1 est ensuite impliqué dans la localisation de BubR1 au Kt et, *via* sa phosphorylation par Mps1, dans le recrutement de Mad1. Une fois Mad1 au Kt, il va y avoir la formation d'un complexe avec C-Mad2 pour former le catalyseur final de la formation du signal inhibiteur le MCC. (B) Au Kt non attaché, lorsque toute la machinerie du SAC est en place, il y a conversion d'O-Mad2 (inactif) en C-Mad2 (capable de lier Cdc20) par sa liaison à Mad1. Une fois Mad2 en conformation « closed », il va lier Cdc20 puis il y aura recrutement de BubR1-Bub3 pour former le complexe inhibiteur de l'APC/C, le MCC capable de retarder le déclenchement de l'anaphase tant que tous les Kt ne sont pas correctement attachés au fuseau mitotique. Inspiré et adapté de (London and Biggins, 2014a)

a. Les évènements

De très nombreuses protéines sont impliquées dans la signalisation du SAC. Leur recrutement aux Kt non attachés se fait de manière séquentielle et est finement régulé (Figure 6). D'abord, AurB est activée aux Kt en début de mitose et contrôle le recrutement et l'activation du premier facteur impliqué dans le SAC, la kinase Mps1 (Nijenhuis et al., 2013; Saurin et al., 2011). AurB agit en phosphorylant Ndc80 (un composant du complexe KMN (KNL1 – Mis12 – Ndc80) essentiel pour les attachements Mt-Kt) ce qui réduit son affinité pour les Mt et l'augmente pour Mps1 et permet alors le recrutement de Mps1 grâce à une interaction avec le domaine CH (Calponin Homology Domain) de Ndc80 (Zhu et al., 2013). Le recrutement de Mps1 semble aussi nécessiter Plk1 car une forme constitutivement active de Plk1 est capable de restaurer la bonne localisation de Mps1 quand AurB est inactivée (Conde et al., 2013).

Mps1 aux Kt va phosphoryler les modules MELT de « Kinetochores-Null Protein 1 » (KNL1) pour permettre le recrutement de Bub1 et Bub3 (Ito et al., 2012; Krenn et al., 2014; London et al., 2012; Primorac et al., 2013; Sheppard et al., 2012; Vleugel et al., 2013, 2015a; Yamagishi et al., 2012; Zhang et al., 2014). Le recrutement et la phosphorylation de Bub1 par Mps1 permet à Bub1 de recruter Mad1 (Heinrich et al., 2014; Kruse et al., 2014; London and Biggins, 2014b; Moyle et al., 2014). Mad1 aux Kt va alors pouvoir recruter à son tour « open-Mad2 » (O-Mad2) et créer une sorte de plateforme pour l'activation de Mad2 et la génération d'un signal inhibiteur de l'anaphase en association avec BubR1, Bub3 et Cdc20 et appelé le MCC (De Antoni et al., 2005; Fava et al., 2011; Luo et al., 2002; Sironi, 2001, 2002; Sudakin et al., 2001). Bub1 va également permettre le recrutement de BubR1 pour la formation de ce MCC (Overlack et al., 2015; Zhang et al., 2015). Le rôle du MMC va être d'inhiber l'activation de l'APC/C et ainsi bloquer la dégradation de ses substrats impliqués dans la sortie de mitose, la CycB et la Sécurine, tant que tous les Kt ne sont pas correctement attachés au fuseau mitotique (Sudakin et al., 2001).

b. Les protéines du SAC et leurs régulateurs

1) Aurora-B

AurB est une kinase de la famille des « Aurora » qui joue un rôle dans le SAC et dans l'attachement des Mt-Kt et l'alignement des chromosomes à la plaque métaphasique. Elle est requise pour la localisation aux Kt des protéines Mps1, Bub1 et Bub3. Cela entraîne ensuite un second niveau d'activation en permettant le recrutement de Mad1, Mad2, Cdc20, BubR1 (et sa phosphorylation) ou encore CENP-E (Ditchfield et al., 2003; Nijenhuis et al., 2013; Vigneron et al., 2004). Le rôle le plus important d'AurB dans le SAC semble être le recrutement de Mps1 aux Kt non attachés (*via* interaction avec son domaine « tetratricopeptide » (TPR)) (Nijenhuis et al., 2013; Saurin et al., 2011). Le retard d'activation de Mps1 et de réponse du SAC après l'inhibition d'AurB est sauvé en forçant la localisation de Mps1 aux Kt (Saurin et al., 2011).

2) Mps1

Mps1 est une kinase essentielle du SAC. Elle est localisée aux Kt et recrutée *via* AurB et Ndc80 (paragraphe précédent). Elle est régulée pendant le cycle avec une activité kinase qui atteint son maximum en phase M. Cette activité est augmentée si le SAC n'est pas satisfait. Mps1 est nécessaire pour un arrêt en mitose notamment suite à une perturbation du fuseau (Liu et al., 2003; Stucke et al., 2002). Elle permet, aux Kt non attachés, le recrutement (et la phosphorylation) de Mad1 (Hardwick et al., 1996; Hewitt et al., 2010; Liu et al., 2003; Santaguida et al., 2010; Sliedrecht et al., 2010) et de Mad2 (Abrieu et al., 2000, 2001; Hewitt et al., 2010; Liu et al., 2003). Mps1 est aussi impliquée dans l'assemblage du complexe inhibiteur de Cdc20 en interphase (Maciejowski et al., 2010). Mps1 phosphoryle BubR1 pour permettre la génération des épitopes 3F3/2 essentiels pour le recrutement de Cdc20 aux Kt non attachés et à l'assemblage du MCC (décrit en partie III.A.3.a) (Conde et al., 2013; Huang et al., 2008). Elle interagit aussi physiquement avec un composant du kinétochore et du complexe KMN, Ndc80. Chez la levure, Mps1 est capable de phosphoryler Ndc80 *in vitro* et facilite, *in vivo*, la phosphorylation de Ndc80. La phosphorylation de Ndc80 est importante car la mutation des sites de phosphorylation de Ndc80 en Alanine (non phosphorylable) résulte en un SAC compromis après traitement au nocodazole alors que leur mutation en acide aspartique (qui mime une phosphorylation) cause un arrêt en métaphase avec un SAC constitutivement actif (Kemmler et al., 2009). Mps1 interagit avec un autre composant du

complexe KMN, KNL-1. KNL-1 est un des substrats majeurs de Mps1 dans un domaine très conservé : les répétitions « MELT » (London et al., 2012; Yamagishi et al., 2012). Cette phosphorylation des régions « MELT » par Mps1 crée des régions de liaison sur KNL-1 pour Bub1 et Bub3 et permet leur recrutement aux Kt. Cela est également régulé par PP1 qui les déphosphoryle (London et al., 2012; Vleugel et al., 2015a; Yamagishi et al., 2012; Zhang et al., 2014).

3) Plk1

La kinase Plk1 se localise aux Kt grâce à son interaction avec Bub1 et BubR1 (Arnaud et al., 1998; Elowe et al., 2007; Goto et al., 2006; Qi et al., 2006). Elle est impliquée dans le recrutement de Mad2, CENP-E, Ndc80 et Cdc20 et sa déplétion / son inhibition induit un délai en mitose dû à l'activation du SAC. L'accumulation de Plk1 aux kinétochores est régulée par la tension exercée par les Mt sur les Kt (voir plus loin) (Ahonen et al., 2005; Sumara et al., 2004). Plk1 va phosphoryler BubR1 pour générer les phospho-épitopes 3F3/2 aux Kt en absence de tension. Cet événement participe au SAC (recrutement de Plk1, Mad2 et Cdc20) et la stabilisation des attachements (Ahonen et al., 2005; Conde et al., 2013; Elowe et al., 2007; Matsumura et al., 2007; Wong and Fang, 2007). Plk1 est également impliquée dans la localisation de Mad1 par la phosphorylation de la T680 de Mad1 (Chi et al., 2008).

4) Bub1

Bub1 est une kinase qui se localise de façon stable aux Kt des chromosomes non attachés de manière bi-orientée mais, à la différence de Mad1 et Mad2, n'est pas complètement exclue du Kt lors de l'attachement. Elle est rapidement phosphorylée après ajout de drogues qui perturbent la formation du fuseau, laissant penser qu'elle surveille les événements aux Kt (Basu et al., 1999; Jablonski et al., 1998; Rischitor et al., 2007; Shah et al., 2004; Sharp-Baker and Chen, 2001; Taylor et al., 2001). Bub1 est requise pour la déphosphorylation des phospho-épitopes 3F3/2 en anaphase (Basu et al., 1999), pour le recrutement de BubR1, CENP-E, Mad1 et Mad2 ainsi que pour la congression des chromosomes (Johnson et al., 2004; Kim et al., 2012; Meraldi and Sorger, 2005; Sharp-Baker and Chen, 2001). Son activité kinase n'est pas requise pour générer un signal inhibiteur et donc pour la signalisation du SAC (Rischitor et al., 2007). En revanche, la phosphorylation de Bub1 par Mps1 ainsi que l'interaction avec son domaine kinase sont nécessaires pour le recrutement de Mad1 (London and Biggins, 2014b; Moyle et al., 2014; Vleugel et al., 2015b). Bub1 se localise aux Kt en interagissant avec les modules « MELT » de KNL1 et la

réexpression de ces modules dans un mutant KNL1 suffit à restaurer la localisation de Bub1, ses fonctions dans le SAC et l'alignement des chromosomes (Krenn et al., 2014; London et al., 2012; Vleugel et al., 2013, 2015a; Yamagishi et al., 2012).

5) BubR1/Mad3

Comme Bub1, BubR1 joue un rôle important dans le SAC et est également impliquée dans le contrôle de l'attachement des Mt-Kt. Elle se localise au niveau des Kt sous l'action d'AurB (qui la phosphoryle également à l'entrée en mitose) et par une interaction avec Bub1 et, contrairement aux autres protéines du SAC, elle n'est pas exclue du Kt par l'attachement stable des Mt (Chan et al., 1999; Ditchfield et al., 2003; Jablonski et al., 1998; Overlack et al., 2015; Taylor et al., 1998, 2001; Zhang et al., 2015). L'activité kinase de BubR1, nécessaire pour son rôle dans le contrôle de l'attachement des Mt-Kt est régulée par la liaison de CENP-E (Mao et al., 2003, 2005) et n'est pas requise pour le SAC (Harris et al., 2005; Rahmani et al., 2009). Son activité dans le SAC dépend en revanche des motifs « KEN » qui participent à la liaison de Cdc20 et à la formation du MCC (détaillé en partie III.A.3.a).

6) Bub3

Bub3 est recrutée aux Kt par les modules « MELT » de KNL1. Elle contient un domaine très conservé de liaison au motif « MELT » phosphorylé par Mps1 (« MELTp ») et les mutations qui visent ce domaine empêchent le recrutement de Bub1 aux Kt et présentent un SAC défectif, suggérant que la reconnaissance par Bub3 de « MELTp » est primordiale pour le SAC et le recrutement de Bub1 (Krenn et al., 2014; Primorac et al., 2013; Windecker et al., 2009; Zhang et al., 2014). Bub3 est aussi un membre du complexe inhibiteur de l'APC/C, le MCC (partie III.A.3.a).

7) Mad1

En cellule humaine en interphase, Mad1 se localise sur les pores nucléaires. En mitose, elle se relocalise aux Kt, d'abord fortement en prométaphase puis seulement sur les chromosomes mal alignés en métaphase (Campbell et al., 2001). Chez *S. cerevisiae*, Mad1 ne semble se localiser aux Kt (ou n'est détectable) que lorsqu'il y a des dommages au fuseau (Gillett et al., 2004). En cellule humaine, des expériences de « fluorescence recovery after photobleaching » (FRAP) ont révélé que Mad1 est stablement associée aux Kt non attachés

puis retirée et relocalisée au pôle après l'attachement (Shah et al., 2004). Elle est recrutée aux Kt *via* une interaction qui nécessite le domaine carboxy-terminal de Bub1 (Brady and Hardwick, 2000; Heinrich et al., 2014; Kim et al., 2012; Kruse et al., 2014; London and Biggins, 2014b; Moyle et al., 2014).

Le rôle principal de Mad1 aux Kt est de recruter Mad2 en le liant directement, puis de l'activer en changeant sa conformation (voir partie suivante) (Campbell et al., 2001; Luo et al., 2002; Sironi, 2002). Des mutants de Mad1 (dans la région C-terminale) incapables de lier Bub1 ne se localisent plus aux Kt, ne sont plus capables de recruter Mad2 et présentent un SAC inactif. Le ciblage forcé de cette version mutante de Mad1 aux Kt restaure le recrutement de Mad2 mais de manière surprenante, le SAC est toujours inactif (comme dans un mutant Mad1 pour lequel la localisation aux Kt de Mad2 actif est forcée), laissant penser que la région C-terminale de Mad1 joue un rôle important dans le SAC en collaboration avec Bub1 (Ballister et al., 2014; Heinrich et al., 2014; Kruse et al., 2014; Moyle et al., 2014). Il est aussi intéressant de noter que le re-ciblage de Mad1 aux Kt attachés en métaphase suffit à réactiver le SAC après que ce dernier ait été satisfait (Ballister et al., 2014; Kuijt et al., 2014). Mad1 semble également jouer un rôle dans la régulation des attachements Mt-Kt en plus du recrutement de Mad2 car chez la drosophile, un mutant Mad1 nul présente, contrairement au mutant Mad2 nul, des défauts de ségrégation des chromosomes dus en partie à une mérotélie persistante (attachement au deux pôles d'un même Kt) (Emre et al., 2011).

8) Mad2

Mad2 se localise transitoirement aux Kt des chromosomes non attachés grâce à son interaction avec Mad1. Elle est exclue du Kt de manière Mt dépendante lors de l'attachement pour prévenir la formation de nouveaux complexes inhibiteurs de l'anaphase (Buffin et al., 2005; Chen et al., 1998; Howell et al., 2000; Shah et al., 2004). Elle se localise également, comme Mad1, sur les pores nucléaires en interphase (Campbell et al., 2001). La localisation de Mad2 aux Kt semble également impliquer le complexe RZZ (Rod/Zw10) pour le recruter et le retirer (Buffin et al., 2005; Caldas et al., 2015; Silió et al., 2015).

La liaison de Mad2 sur Mad1 aux Kt entraîne un important réarrangement de sa conformation et elle passe d'une forme inactive « open » (O-Mad2, incapable de lier Cdc20) à une forme active « closed » (C-Mad2), qui est capable de se lier avec Cdc20 (Luo et al., 2002;

Sironi, 2001, 2002; Vink et al., 2006). Le modèle des évènements pour la formation du complexe C-Mad2:Cdc20 qui semble aujourd'hui faire consensus est appelé « Mad2 template ». Le complexe Mad1:C-Mad2 va à son tour permettre le recrutement d'autres O-Mad2 (dimérisation) et accélérer leurs transitions en conformation c-Mad2. Les c-Mad2 ainsi produits vont être relargués pour pouvoir interagir avec Cdc20 pour former le MCC (partie III.A.3.a) (De Antoni et al., 2005; Fava et al., 2011; Luo et al., 2004; Mapelli et al., 2006; Nezi et al., 2006; Simonetta et al., 2009).

2. La surveillance des défauts Mt-Kt.

Le SAC est en charge de surveiller que les attachements Mt-Kt soient corrects afin d'éviter des erreurs de ségrégation des chromosomes. Le mécanisme de surveillance se met en place au niveau du Kt avec toute la machinerie décrite au paragraphe précédent. Cependant, le type de défaut aux Kt surveillé par le SAC n'est pas encore bien compris. Deux hypothèses existent actuellement, la première propose que le SAC surveille la tension exercée aux Kt par les Mt lorsqu'ils sont attachés (Li and Nicklas, 1995). La seconde propose plutôt un modèle dans lequel c'est directement l'attachement qui est intégré par le SAC (Rieder et al., 1995).

a. Le modèle de tension

Le premier argument en faveur du modèle de tension est apporté par Li et Nicklas en 1995. Dans leur étude, les auteurs ont appliqué une tension à l'aide d'une micro-aiguille sur un Kt non attaché de spermatocytes de Mante religieuses et mis en évidence que dans ces conditions, les cellules rentraient plus rapidement en anaphase (~56 min au lieu de 5-6H) (Li and Nicklas, 1995). Plus tard, chez *S. cerevisiae*, d'autres expériences ont également suggéré que la tension aux Kt était importante. Des cellules ont été forcées à se re-diviser sans avoir préalablement répliqué leur ADN, générant ainsi des chromosomes sans chromatide sœur et donc sans la possibilité d'établir une tension. Les auteurs ont ainsi mis en évidence une activation du SAC qu'ils imputent à l'absence de tension et des résultats similaires ont été obtenus à partir de cellules méiotiques (Shonn et al., 2000; Stern and Murray, 2001). Par « Förster resonance energy transfer » (FRET), il a également été démontré que la phosphorylation des substrats d'AurB aux Kt dépend de la distance entre la kinase et le Kt externe. Repositionner AurB plus près du Kt empêche la stabilisation des Mt-Kt et active le

SAC, la tension serait donc détectée par AurB en l'éloignant de ses substrats (Liu et al., 2009). Mais ici on ne peut pas exclure que ce soit l'absence d'attachement stable, à cause de la présence d'AurB, qui soit à l'origine de l'activation du SAC plutôt que le manque de tension. Pour être complet, on peut noter un modèle un peu différent prenant en compte la tension mécanique des Mt. En effet, en comparant la distance entre deux protéines étiquetées avec un marqueur fluorescent, Ndc80-GFP (Kt externe) et « centromere identifier » Cid-mCherry (Kt interne), il a été observé une corrélation entre leur distance et l'activation du SAC (Maresca and Salmon, 2009) ce qui suggère que le SAC surveillerait plutôt la tension intraKt.

b. Le modèle d'attachement

Ce modèle propose que ce soit l'occupation de tous les sites d'attachements des Mt sur un Kt qui soit surveillé par le SAC. Dans leur expérience de 1995, Rieder et collaborateurs ont mis en évidence que la destruction du dernier Kt non attaché suffisait à éteindre le SAC. Le Kt détruit n'est pas capable de maintenir le SAC actif suggérant donc que le signal inhibiteur vient du Kt et que ce dernier n'est plus produit quand il est bien attaché (Rieder et al., 1995). En adéquation avec ce modèle, il faut noter que la mérotélie semble également difficilement détectée par le SAC. En cellules PtK1 qui présentent des anaphases avec des chromosomes retardés dans ~1% des cas, cela est augmenté jusqu'à ~18% quand elles sont traitées avec une faible dose de nocodazole. Ces chromosomes retardés montrent des chromatides qui présentent un attachement mérotélique et ne présentent pas de signal Mad2 (alors que la mérotélie crée un problème de tension). Ces observations semblent donc indiquer que c'est bien l'attachement plutôt que la tension qui est intégré par le SAC (Cimini et al., 2001). Plus récemment, une compétition entre Mps1 et les Mt pour la liaison à Ndc80 a été mise en évidence chez *S. cerevisiae* et chez l'homme. La liaison des Mt sur Ndc80 aux Kt retire Mps1 et le rend alors incapable de phosphoryler les modules « MELT » de KNL1 et rend ainsi le SAC inactif (Aravamudhan et al., 2015; Hiruma et al., 2015; Ji et al., 2015). Par ailleurs, un mutant de Ndc80 pour lequel les fonctions d'attachement des Mt sont préservées mais pas celles de corrections (non phosphorylable par AurB) présente un SAC satisfait par l'attachement des Mt aux Kt même quand il n'y a pas bi-orientation. Ceci renforce le modèle selon lequel l'activité du SAC serait modulée par l'attachement des Kt aux Mt (Etemad et al., 2015; Tauchman et al., 2015).

c. Le rôle central d'AurB

Nous avons vu précédemment qu'AurB joue un rôle central dans la mise en place du SAC. Un autre rôle majeur d'AurB aux Kt est de permettre l'établissement d'attachements Mt-Kt bi-orientés en déstabilisant les mauvais attachements (Hauf et al., 2003; Kallio et al., 2002; Lampson et al., 2004; Tanaka et al., 2002b). Un des moyens qu'elle utilise est de recruter la kinésine déstabilisatrice MCAK aux Kt (Lan et al., 2004) mais également de réduire l'affinité de Ndc80 pour les Mt (Cheeseman et al., 2006). Les fonctions d'AurB peuvent donc permettre de faire un lien entre les deux modèles de détection des erreurs d'attachements Mt-Kt. En répondant à un manque de tension et en créant des Kt non attachés, AurB active le SAC dont elle a préalablement chargé tous les composants. Cette hypothèse est nettement étayée par les résultats de Pinsky et collaborateurs qui montrent que chez des mutants du Kt qui ne présentent pas d'attachement stable (chez *S. cerevisiae*), l'inhibition d'AurB suffit à restaurer ces attachements (plus de déstabilisation) et à éteindre le SAC (Pinsky et al., 2006). De plus, la phosphorylation de différents substrats par AurB aux kinétochores est strictement corrélée à l'état d'attachement des chromosomes au fuseau mitotique : lorsque les chromosomes sont correctement attachés aux Mt, ces phosphorylations vont diminuer.

Il est donc proposé qu'AurB soit au sommet de la pyramide de signalisation en permettant, d'une part, la correction des erreurs d'attachement en créant des Kt non attachés et en « surveillant » la mise sous tension et, d'autre part, en permettant l'activation directe du SAC en présence de ces Kt non attachés (Biggins and Murray, 2001; Ditchfield et al., 2003; Hauf et al., 2003; Santaguida et al., 2011; Tanaka et al., 2002b). Son rôle dans la mise en place de la signalisation du SAC est, par ailleurs, indépendant de son rôle dans l'attachement.

3. L'inhibition de l'APC/C

Le SAC bloque l'entrée en anaphase en inhibant l'APC/C qui ne peut alors plus ubiquitinyler ses substrats (CycB et Sécurine) pour promouvoir la sortie de mitose. Pour cela, il génère un signal inhibiteur aux Kt non attachés (Rieder et al., 1995) qui est, à l'heure actuelle, considéré comme étant le MCC composé de Mad2, BubR1, Bub3, et Cdc20 (Sudakin et al., 2001). Cependant, la véritable nature du signal inhibiteur est encore sujet à débat.

a. Formation du complexe inhibiteur de l'APC/C

La liaison de Mad1 aux Kt permet le recrutement et l'activation de Mad2 comme évoqué dans la partie III.A (Figure 6). Cela permet à C-Mad2 de lier et de former un complexe avec Cdc20 capable de prévenir l'activation de l'APC/C et la dégradation de ses substrats (Fang et al., 1998; Hwang et al., 1998; Kallio et al., 1998; Kim et al., 1998; Wassmann and Benezra, 1998). D'autres protéines font également partie de ce complexe inhibiteur, BubR1/Mad3 (Chan et al., 1999; Hardwick et al., 2000; Hwang et al., 1998; Sudakin et al., 2001) et Bub3 (qui servirait de plateforme d'assemblage) (Fraschini, 2001). En interphase et en début de mitose, le MCC est formé indépendamment du Kt (qui n'est pas encore totalement formé) (Fraschini, 2001; Meraldi et al., 2004; Sudakin et al., 2001) puis ensuite, sa formation est catalysée aux Kt non attachés en réponse au SAC. Le MCC est un inhibiteur 3000 fois plus efficace que C-Mad2 : Cdc20 seul (Sudakin et al., 2001). En revanche, la véritable composition du MCC final est encore soumise à débat. Cdc20 est capable de former un complexe comprenant uniquement BubR1 et Bub3 et exempt de Mad2 (appelé BCC), ce complexe semble d'ailleurs être un meilleur inhibiteur de l'APC/C (Fang, 2002; Tang et al., 2001). Le rôle de Mad2 serait alors uniquement de permettre la formation du complexe en modifiant la conformation de Cdc20, rendant accessible un site de liaison à BubR1 et serait retiré pour former le complexe final (Davenport et al., 2006; Fang, 2002; Han et al., 2013; Kulukian et al., 2009; Nilsson et al., 2008).

Mais des résultats récents utilisant des sous-complexes *in vitro* viennent contredire cette hypothèse. En effet, l'absence de Mad2 cause une baisse de l'efficacité d'inhibition de l'APC/C suggérant alors, avec d'autres résultats, qu'il a un rôle de stabilisation dans ce complexe (Chao et al., 2012; Kaisari et al., 2016). De plus, chez la levure, BubR1 serait nécessaire pour la liaison stable de Mad2 à Cdc20. L'expression d'une protéine de fusion Mad2-BubR1 (mais pas la surexpression de l'une ou l'autre) induit un arrêt en métaphase indépendant du Kt ou des autres protéines du SAC, arguant en faveur d'un rôle plus important pour MCC plutôt que pour le BCC (Lau and Murray, 2012). Des expériences d'immunoprécipitation de l'APC/C à partir de cellules arrêtées en mitose à cause du SAC ont montré que les protéines Mad2, BubR1 et Cdc20 sont associées à l'APC/C (Braunstein et al., 2007). Mad2 est également capable d'inhiber Cdc20 en se liant sur un site requis pour l'interaction/activation de l'APC/C (Izawa and Pines, 2012). Le MCC est capable de lier deux molécules de Cdc20 par BubR1. BubR1 contient deux sites de liaison à Cdc20, un site fort

entre les résidus 490 et 560, mais la mutation de ce site ne semble pas avoir d'effet sur le SAC. Un second site est présent dans la région amino-terminale et est fortement spécifique pour Cdc20 lié à Mad2, la formation du MCC et pour l'inhibition de l'APC/C. En fait, ce sont deux régions « KEN-box » qui sont impliquées dans cette liaison (Burton and Solomon, 2007; Davenport et al., 2006; Elowe et al., 2010; King et al., 2007; Lara-Gonzalez et al., 2011; Malureanu et al., 2009; Rahmani et al., 2009). La « KEN-box » située en C-terminale semble requise pour l'inhibition de l'APC/C lorsque celui-ci est déjà activé par Cdc20 pour bloquer le recrutement des substrats et ainsi inhiber ou rapidement ré-inhiber (après satisfaction du SAC) l'APC/C (Izawa and Pines, 2015; Lara-Gonzalez et al., 2011; Malureanu et al., 2009). Deux autres régions de BubR1 ont été identifiées comme importantes pour maintenir la liaison avec Cdc20 et l'intégrité du MCC, la « Phe-Box » et la « D-box », présentes dans la région centrale de la protéine (Diaz-Martinez et al., 2015).

b. Rôle du MCC

Deux hypothèses sont actuellement avancées pour expliquer le mécanisme par lequel le MCC inhibe l'activation de l'APC/C. D'abord, en liant Cdc20 et en se liant sur la séquence de liaison de Cdc20 sur l'APC/C, le MCC séquestre Cdc20 et l'empêche de rentrer en contact avec l'APC/C pour former un récepteur des motifs de dégradation D-box (Chao et al., 2012; Herzog et al., 2009). La seconde hypothèse propose que la liaison du MCC sur l'APC/C active une sous-unité de l'APC/C (APC15) et cela favorise l'ubiquitinylation de Cdc20 et sa destruction. Mais cette fonction semble surtout requise pour permettre l'extinction du SAC et l'entrée rapide en anaphase (Foster and Morgan, 2012; Mansfeld et al., 2011; Nilsson et al., 2008; Uzunova et al., 2012). Un troisième mécanisme, indépendant du MCC, pour inhiber Cdc20 pourrait être sa phosphorylation par Bub1 et Plk1, ce qui l'empêcherait directement d'activer l'APC/C (Jia et al., 2016; Tang et al., 2004).

4. Satisfaction du SAC et sortie de mitose

Une fois que tous les Kt sont correctement attachés, le SAC est dit « satisfait » et la cellule entre alors en anaphase. Pour cela, il faut rapidement lever l'inhibition de l'APC/C et empêcher la formation de nouveau complexe MCC. Pour autant, il semble que la réponse du SAC ne se fasse pas en tout ou rien (« on » ou « off »). La « force » du signal, et aussi son

arrêt, dépendent de la quantité de Mad2 recrutée aux Kt et de complexe inhibiteur MCC formés dans un modèle de rhéostat plutôt que d'interrupteur (Collin et al., 2013). Une étude dans ce sens a montré que la « force » du signal dépend du nombre de Kt non attachés (Dick and Gerlich, 2013).

a. Rôle des phosphatases

Le SAC est activé par phosphorylation des substrats d'AurB. Pour permettre l'extinction et le contrôle du SAC, une activité phosphatase est donc potentiellement nécessaire aux Kt pour mettre fin à la signalisation. PP1 semble jouer ce rôle : ainsi, une surexpression de cette phosphatase chez *S. cerevisiae* prévient l'activation du SAC en réponse à des défauts d'attachements (Pinsky et al., 2009). Chez *S. pombe*, PP1 est également requise pour l'entrée en anaphase (Vanoosthuyse and Hardwick, 2009). Elle semble agir en se liant à KNL1 sur le motif « RVSF », cette liaison est inhibée par AurB (et favorisée par le recrutement par un SAC actif de PP2-B56 qui contre AurB). La persistance de l'interaction entre PP1 et KNL1 est suffisante pour éteindre le SAC (Espert et al., 2014; Liu et al., 2010; Meadows et al., 2011; Nijenhuis et al., 2014; Rosenberg et al., 2011; Shepperd et al., 2012).

b. Le mécanisme dit de « streaming »

La liaison des Mt aux Kt permet le recrutement de moteurs moléculaires comme le complexe dynéine/dynactine. Plusieurs observations ont montré que les protéines du SAC comme Mad1, Mad2 ou Rod sont exclues du Kt et relocalisées sur le fuseau lors de l'attachement des Kt par un mécanisme vraisemblablement dépendant de la dynéine/dynactine (Basto et al., 2004; Buffin et al., 2005; Howell et al., 2000, 2001; Karess, 2005; Wojcik et al., 2001). La liaison des Mt sur les Kt a également pour effet de retirer Mps1 et ainsi d'inactiver la phosphorylation de KNL1 (Aravamudhan et al., 2015) (partie III.A.1.b.2). L'autophosphorylation de Mps1 semble également nécessaire pour son retrait du Kt et donc l'extinction du SAC et l'entrée en anaphase. L'inhibition de l'activité kinase de Mps1 augmente son temps de résidence aux Kt (Jelluma et al., 2010).

c. L'ubiquitinylation de Cdc20

L'ubiquitinylation de Cdc20 semble avoir un rôle important dans le SAC. D'une part elle permet, en entraînant sa dégradation, d'inhiber Cdc20 et donc l'APC/C (Partie III.A.3.b) et d'autre part, elle semble également impliquée dans le désassemblage rapide du MCC et l'activation rapide de l'APC/C quand le SAC est satisfait. En effet, la multi-ubiquitinylation de Cdc20 conduit à la dissociation du MCC (processus contrôlé par un Cdc20 non ubiquitinylable) (Reddy et al., 2007). Ainsi l'ubiquitinylation de Cdc20 permet de réguler l'association du MCC à l'APC/C en entraînant la dégradation du Cdc20 dans le complexe, ce qui a pour effet de déstabiliser le MCC et permettre ainsi la levée rapide de l'inhibition de l'APC/C quand le SAC est satisfait. La sous-unité de l'APC/C responsable de cette polyubiquitinylation est l'APC15 (il n'y a pas d'autre substrat connu), située proche du site de liaison du MCC, et sa déplétion entraîne un arrêt prolongé en mitose, montrant ainsi le rôle de la polyubiquitinylation de Cdc20 dans l'extinction du SAC (Foster and Morgan, 2012; Mansfeld et al., 2011; Uzunova et al., 2012).

d. p31^{comet} et TRIP13

p31^{comet} (nommée après p31) est un interacteur de Mad2 dont l'association coïncide avec la dissociation de Cdc20. La surexpression de p31 dans des cellules arrêtées par le SAC entraîne la sortie de mitose (Habu et al., 2002). De même, la déplétion de p31 cause un délai en métaphase après le retrait du nocodazole en retardant la dissociation entre Mad2 et Cdc20 (nécessaire pour l'extinction du SAC) et cette dissociation est encore plus difficile en présence d'une forme de Cdc20 non ubiquitinylable (Jia et al., 2011; Xia et al., 2004). Cela montre que l'ubiquitinylation de Cdc20 et p31 sont deux mécanismes importants pour la dissociation de Mad2. De manière générale, p31 permet le désassemblage du MCC en liant Mad2, ce qui entre en compétition avec la liaison de BubR1 et entraîne le relargage de Cdc20 (Chao et al., 2012; Teichner et al., 2011; Varetta et al., 2011). La liaison de p31 à Mad2 stimule également la phosphorylation de Cdc20 par Cdk1 et cela aide à la dissociation du MCC (Miniowitz-Shemtov et al., 2012). Un facteur a récemment été découvert comme favorisant le désassemblage du MCC par p31, il s'agit de « thyroid receptor interacting protein 13 » (TRIP13). C'est une AAA ATPase qui interagit avec p31 pour permettre le relargage de Mad2 (Eytan et al., 2014). La déplétion de TRIP13 entraîne un délai dans l'activation de l'APC/C et bloque les cellules en métaphase à cause de l'absence de

dissociation du MCC par p31 (Wang et al., 2014). Son rôle exact semble être de changer la conformation de Mad2 de « closed » à « open » et ainsi de l'inactiver en collaboration avec p31. En adéquation avec ce modèle, des cellules HeLa mutantes pour p31 voient ce changement de conformation ralenti alors que les cellules mutantes pour TRIP13 ne contiennent que la forme C-Mad2 (Ma and Poon, 2016; Ye et al., 2015b).

B. SAC et aneuploïdie

L'aneuploïdie correspond à un gain d'une partie ou de la totalité d'un ou plusieurs chromosomes. C'est un marqueur retrouvé dans de très nombreux cancers humains (Duijf et al., 2013; Mertens et al., 1994) et l'aneuploïdie a été proposée au début du XX^{ème} siècle par le biologiste Allemand Theodor Boveri comme une cause possible des cancers (Boveri, 2008) (Figure 7).

1. L'aneuploïdie due à des défauts de SAC

Comme nous venons de le voir, le SAC a pour vocation d'éviter les erreurs de ségrégations des chromosomes. Chez plusieurs espèces, un défaut de SAC causé par la mutation d'une protéine de la cascade de signalisation entraîne des problèmes de ségrégation des chromosomes et de l'aneuploïdie (Baker et al., 2004; Basu et al., 1999; Dobles et al., 2000; Kitagawa and Rose, 1999; Li and Murray, 1991; Michel et al., 2001; Schliekelman et al., 2009). C'est également le cas pour la surexpression de Mad2 (Schvartzman et al., 2011; Sotillo et al., 2007, 2010). On retrouve également des défauts du SAC dans certains cancers. Par exemple, les gènes BUBR1 et BUB1 sont mutés, entraînant une instabilité génétique et de l'aneuploïdie dans des cancers du côlon. Cela suggère que la perte (ou la faiblesse) du SAC contribue à la tumorigénèse dans ce cas (Cahill et al., 1998). Ce lien entre perte de fonction du SAC et cancer est également mis en évidence dans un syndrome humain rare, le « mosaic cariegated aneuploidy », qui présente une forte prédisposition à l'aneuploïdie et aux cancers chez l'enfant (Hanks et al., 2004).

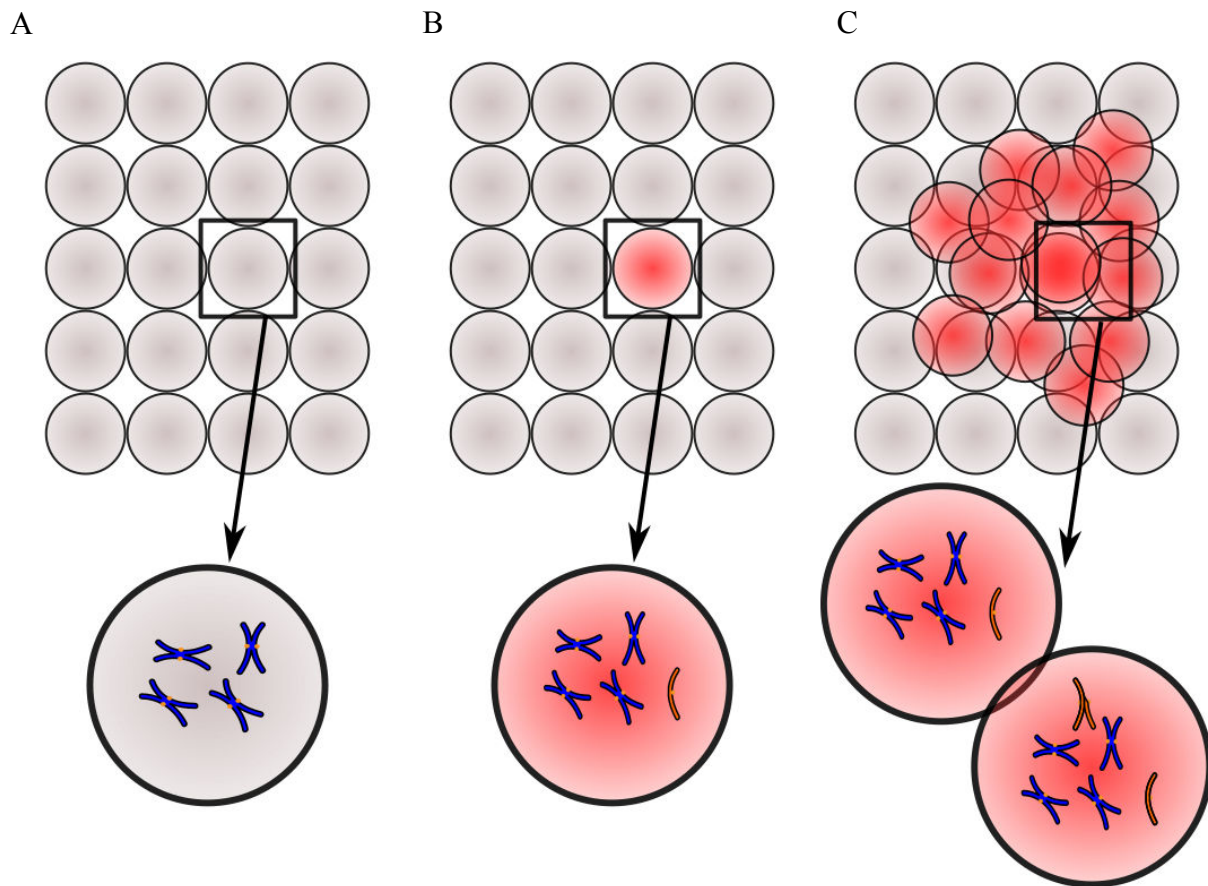


Figure 7 : Aneuploïdie et tumorigénèse. Dans un tissu sain (A), lors de la division cellulaire, un défaut de ségrégation de tout ou partie d'un chromosome peut survenir en raison d'un problème dans la formation du fuseau mitotique ou du SAC. Une des deux cellules fille hérite alors d'un nombre anormal de chromosome (B) ce qui peut conduire à une instabilité génétique et lui conférer un avantage prolifératif pouvant mener à la formation de tumeurs (C) et à la carcinogénèse (Janssen and Medema, 2013).

2. Aneuploïdie et tumorigénèse

Cancer et aneuploïdie étant fréquemment retrouvés associés (Duijf et al., 2013; Mertens et al., 1994), il est judicieux de se demander s'il existe un lien de causalité entre l'un et l'autre : l'aneuploïdie est-elle un facteur induisant la tumorigénèse ou une conséquence de celle-ci ?

Pour répondre à cette question, de nombreuses expériences ont été menées chez la souris en créant des lignées mutantes pour des gènes du SAC. La mutation de Mad1, Mad2, CENP-E, ou encore Bub1 (à l'état hétérozygote) entraîne chez les souris, le développement de tumeurs spontanées associées à de l'aneuploïdie (Iwanaga et al., 2007; Jeganathan et al., 2007; Michel et al., 2001; Weaver et al., 2007). C'est également le cas pour la surexpression de Mad2 et Bub1 (Ricke et al., 2011; Sotillo et al., 2010). L'aneuploïdie dans les cellules induit l'activation de p53 et l'apoptose. La perte de p53 offre un avantage aux cellules aneuploïdes qui peuvent alors proliférer et favoriser le développement de tumeurs (Li et al., 2010). Chez la drosophile, l'instabilité chromosomique induit également l'apoptose, de façon indépendante de p53 (contrairement aux mammifères) *via* la kinase « c-Jun N-terminal kinases » (JNK). Quand les voies apoptotiques sont inactivées dans des cellules épithéliales de la larve, l'aneuploïdie contribue alors à la prolifération cellulaire et à la formation de tumeurs (Dekanty et al., 2012). En revanche, une trop forte et brutale aneuploïdie dans les cellules humaines en culture est délétère et conduit à la mort de ces cellules (Janssen et al., 2009, 2011; Silk et al., 2013).

Ensembles, ces données montrent que l'aneuploïdie modérée est un facteur favorisant la tumorigénèse et qu'elle s'associe à d'autres mutations (perte d'un suppresseur de tumeurs ou gain d'un oncogène (Baker et al., 2009)) au cours du processus oncogénique. En revanche, elle devient létale pour les cellules quand elle est trop importante, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles thérapeutiques (Janssen et al., 2009, 2011).

IV. Le Nb de drosophile

Le neuroblaste de drosophile (Nb) est une cellule souche neurale polarisée, présente dans le cerveau de la larve, et à l'origine de la formation des neurones. Le Nb se divise de manière asymétrique pour donner naissance à deux cellules filles différentes en taille et en destin (Figure 8a). La plus petite va, à terme, se différencier en neurones alors que la grosse va rester un Nb (auto-renouvellement). Cela est essentiel pour l'homéostasie du système nerveux central de la larve (SNC). C'est un modèle très puissant pour l'étude de la mise en place et de l'effet de la polarité cellulaire sur l'homéostasie tissulaire et la tumorigénèse (Li et al., 2014). Dans cette partie, je vais présenter les connaissances actuelles sur ce modèle ainsi que les effets sur l'homéostasie tissulaire (et la tumorigénèse) de la dérégulation des mécanismes de polarité et de différenciation/prolifération.

A. Les différents types de Nb

Les Nb embryonnaires sont issus de la délamination de cellules du neurectoderme (Skeath and Thor, 2003). Après une phase de prolifération qui suit l'éclosion de la larve, ces Nb entrent en quiescence. Ils connaissent ensuite une seconde vague d'expansion au stade larvaire qui correspond à la fin du stade L1/début de L2 pour atteindre un nombre d'environ 85-100 par lobes et cessent de se diviser 20 à 30 h après la pupation (Ito and Hotta, 1992). Il existe deux types de Nb, selon leur lignage, qui composent la population totale des Nb du cerveau central (Bello et al., 2008; Boone and Doe, 2008; Bowman et al., 2008). Les Nb de type I sont majoritaires, ils se divisent asymétriquement pour donner un Nb (auto-renouvellement) et une plus petite cellule, la « ganglion mother cell » (GMC), qui se divisera une fois et se différenciera à terme en neurone. Ces Nb expriment le facteur de transcription pro-neural *Asense* (*Ase*) (Jarman et al., 1993) et localisent *Prospero* (*Pros*), un autre facteur de transcription, au pôle basal lors de la mitose (Hirata et al., 1995). Les Nb de type II, au nombre de 8 par hémisphère (dans la région dorso-médiane), n'expriment ni *Ase* ni *Pros* et leur division asymétrique donne naissance à un Nb ainsi qu'à une cellule appelée « intermediate neural progenitor » (INP) au lieu d'une GMC. Ces INP d'abord immatures, mûrissent ensuite par un mécanisme dépendant des protéines *Brat* et *Numb* et se mettent à exprimer *Ase* et *Pros*.

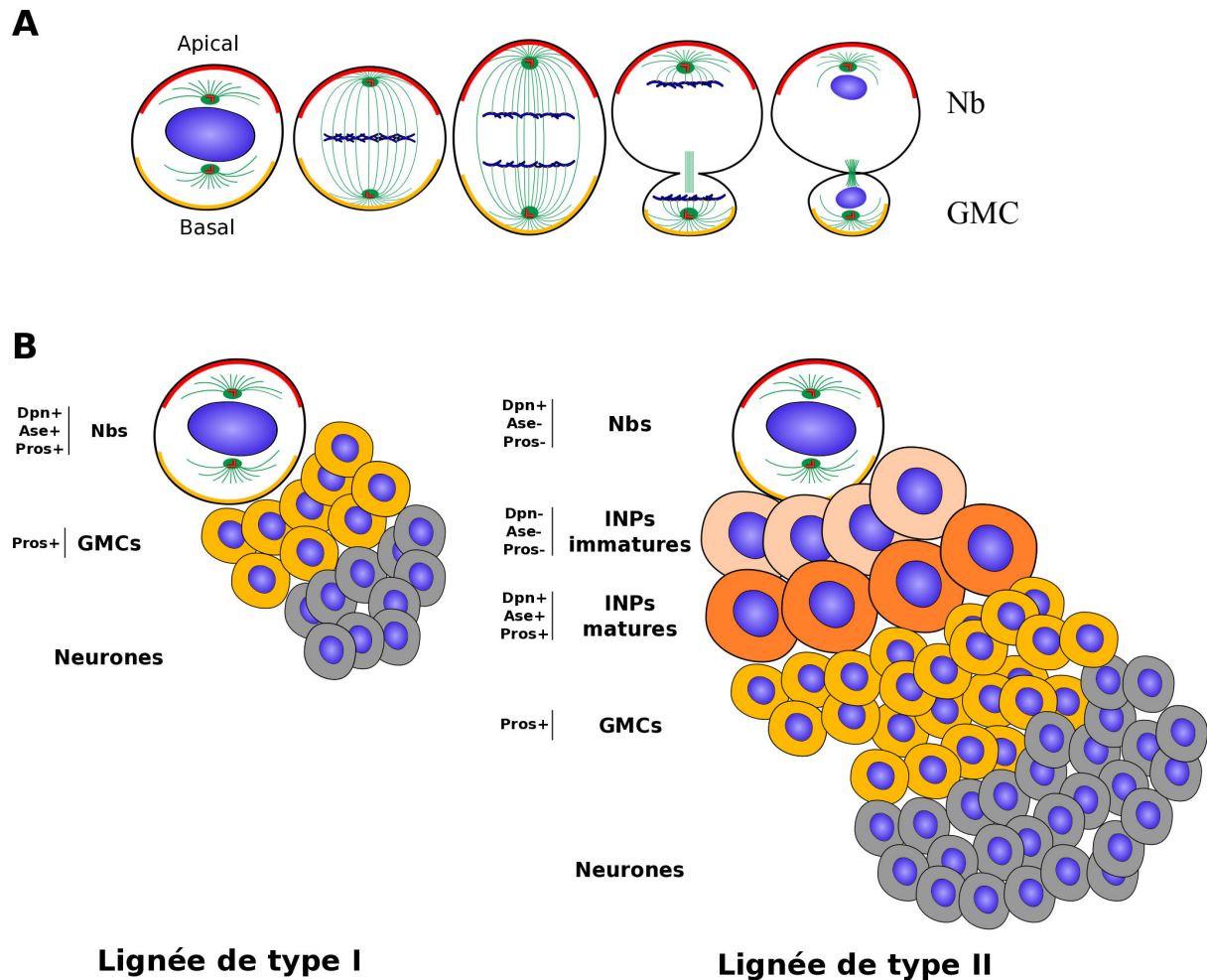


Figure 8 : La division asymétrique et le lignage cellulaire des Nb de type I et II. (A) Schéma de la division asymétrique d'un Nb. La division du Nb est asymétrique en taille et en destin. La petite cellule hérite des déterminants de polarité basale (jaune) et deviendra une GMC qui se différenciera et donnera à terme deux neurones. La plus grande cellule, quant à elle, hérite des déterminants de polarité apicale (rouge) et conservera une identité de cellule souche (Nb). **(B)** Dans la lignée cellulaire de type I (gauche), la division asymétrique va engendrer la formation de plusieurs GMC (jaune) qui expriment le marqueur Pros et qui à terme se différencieront en neurones. Dans la lignée de type II (droite), la division asymétrique du Nb va, dans un premier temps, donner naissance à un INP immature (rose) qui n'exprime ni Pros ni Ase, et qui va ensuite mûrir en INP mature (orange) en gagnant l'expression de Pros. Cet INP mature va se diviser asymétriquement à son tour en un INP et une GMC (jaune) exprimant Pros et qui se différenciera à terme en neurones (gris).

Ils deviennent alors capables de se diviser alors de manière asymétrique (mais morphologiquement symétrique) pour donner naissance à un INP et à une GMC (Bello et al., 2008; Boone and Doe, 2008; Bowman et al., 2008). Ces Nb de types II sont capables de former un nombre bien plus important de neurones que les types I (10 neurones au lieu de 2, 400-500 au total contre 100-150) malgré leur faible nombre du fait de la production des INP qui vont générer plus de GMC (Bello et al., 2008; Boone and Doe, 2008) (Figure 8b).

Le maintien du lignage des Nb de type II est assuré par de nombreuses protéines. Parmi elles, « Pointed P1 » (PntP1) appartient à la famille des facteurs de transcription « E26 transformation-specific » (Ets). Le rôle de PntP1 est de bloquer l'expression d'Ase dans les types II et les INP immatures en inhibant l'action de Yan, un répresseur des Ets. La perte de PntP1 entraîne une expression ectopique d'Ase et la perte des INP. L'expression de PntP1 dans les types I induit la formation de cellules filles proches des INP et non plus des GMC (Zhu et al., 2011). Le facteur de transcription à motif « zinc finger » Klumpfuss (Klu) participe lui aussi au maintien de l'identité du Nb de type II. Il n'est exprimé que dans les Nb de types I et II et INP matures mais pas dans les INP immatures où son activité est inhibée par Brat, il permet alors de faire la distinction entre les deux stades des INP. La perte de Klu entraîne la perte des types II à cause d'une différenciation prématurée et son expression ectopique en INP induit leur dédifférenciation en type II (Berger et al., 2012; Xiao et al., 2012). Numb hérité par l'INP immature, inhibe la voie Notch pour limiter l'expression des facteurs de transcription eIF4E et Myc. Dans le cas d'une hyperactivation de Notch dans les INP, ces deux facteurs sont surexprimés et cela conduit à une surprolifération dans le SNC (Song and Lu, 2011). Trithorax (Trx) est un acteur du lignage de type II. Les types II mutants pour Trx perdent peu à peu leur capacité à faire des INP au profit des GMC et dérivent en type I. Trx maintient l'identité des types II de manière épigénétique en conservant actif le locus comprenant le gène du facteur de transcription Buttonhead (Btd) via l'activité méthyltransférase du complexe « SET domain containing 1 - myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia » (SET1/MLL) (Komori et al., 2014). Btd participe également au maintien des INP en limitant leur différenciation prématurée en GMC en supprimant l'expression de Pros dans les INP immatures en coopération avec PntP1 (Xie et al., 2014).

Au niveau des INP matures, le premier facteur identifié est Earmuff (Erm). Il fonctionne de manière cellule autonome pour maintenir le potentiel de développement restreint des INP. Elle joue son rôle en association avec des composants du complexe de

remodelage de la chromatine « switch/sucrose nonfermentable » (SWI/SNF) que sont Brahma (Brm), l'histone désacétylase HDAC3 et Osa (qui induit le facteur de transcription Hamlet). Ensembles, ces protéines induisent un programme transcriptionnel dans les INP qui limite leur auto-renouvellement (en activant notamment Pros pour limiter la prolifération) et prévient leur dédifférenciation en Nb de type II (en inhibant la voie Notch) (Eroglu et al., 2014; Janssens et al., 2014; Koe et al., 2014; Weng et al., 2010).

B. La polarité et l'orientation du fuseau dans le Nb

1. La polarité apico-basale

Le Nb est une cellule souche polarisée selon un axe apico-basal. Cette polarité est établie par la répartition différentielle de déterminants corticaux au pôle apical ou au pôle basal (Figure 9). A l'issue de la division asymétrique, la petite cellule (GMC ou INP) va hériter des déterminants basaux et la grosse va, quant à elle, hériter des apicaux (Figure 8a).

Le pôle apical est défini par la présence du complexe kinase PAR. Ce complexe est composé de la kinase aPKC, PAR-6 et PAR-3/Bazooka (Baz). L'activité d'aPKC est critique dans ce complexe car l'association de différents partenaires au cortex va être régulée par son activité kinase. aPKC est dans un premier temps inhibé par la présence de la protéine Lgl qui prend la place de Baz et qui bloque l'activité kinase d'aPKC (Atwood and Prehoda, 2009; Lee et al., 2006b; Yamanaka et al., 2003). Le complexe PAR est activé grâce à la phosphorylation de PAR-6 par AurA. Cela participe à la localisation et à l'activation d'aPKC et permet le relargage de Lgl phosphorylé par aPKC. Il y a alors recrutement de Baz pour l'activation complète d'aPKC (Atwood and Prehoda, 2009; Lee et al., 2006a; Wang et al., 2006; Wirtz-Peitz et al., 2008). De façon intéressante, AurA devenant active en mitose, ce processus d'activation permet donc de coupler l'activation d'aPKC avec l'entrée en mitose. Le complexe PAR actif est alors responsable, par phosphorylation directe, de l'exclusion au cortex apical et de la localisation au cortex basal des protéines Miranda (Mira) et Numb (Atwood and Prehoda, 2009; Smith et al., 2007; Wirtz-Peitz et al., 2008).

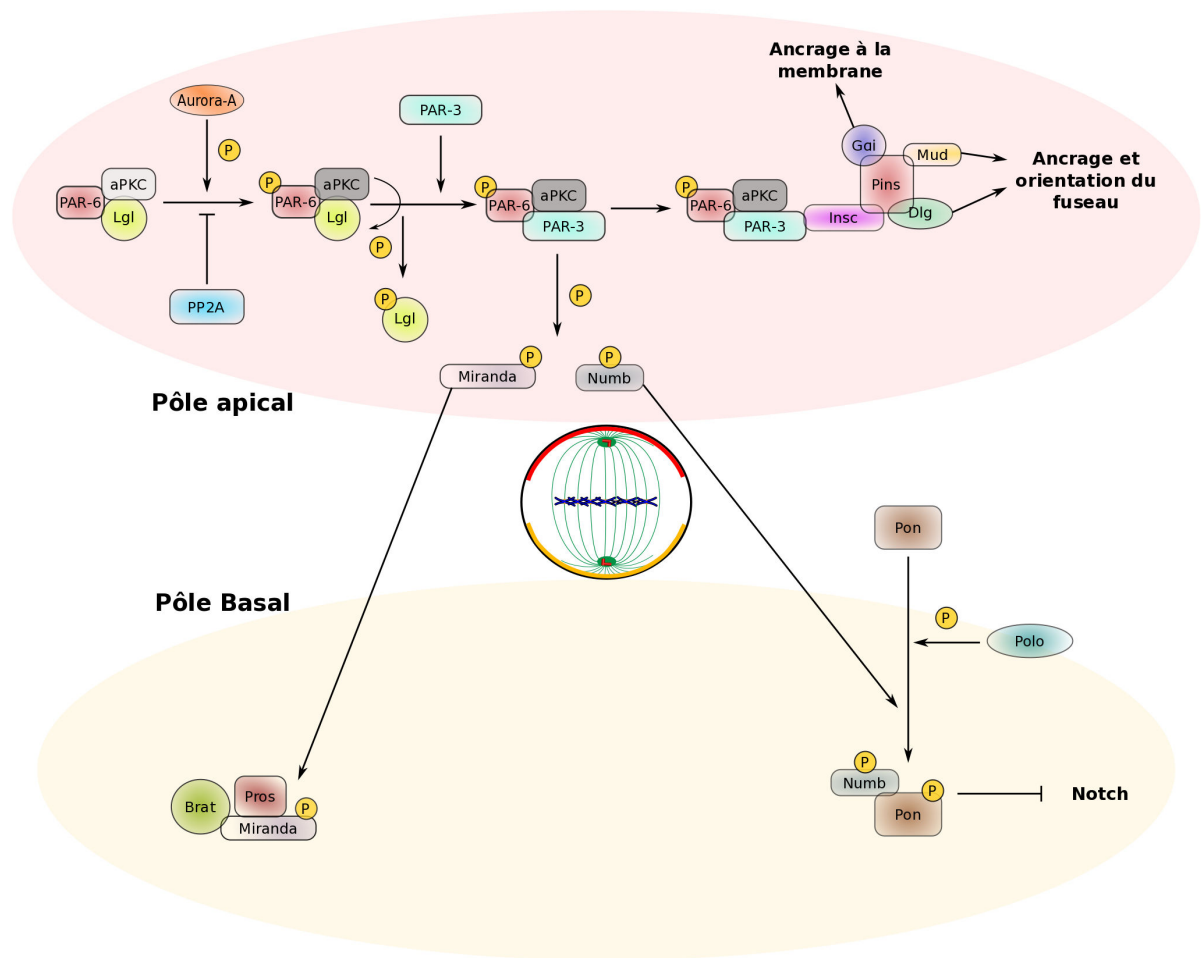


Figure 9 : Mise en place de la polarité apico-basale du Nb de *D. melanogaster*. Au pôle apical, au début de la prophase, la kinase AurA va phosphoryler PAR-6, membre du complexe PAR, ce qui permet l'activation d'un autre membre du complexe, aPKC, et la phosphorylation ainsi que l'exclusion de Lgl. Cette exclusion permet le recrutement de PAR-3/Baz pour former le complexe PAR actif. Le complexe PAR phosphoryle, *via* aPKC, les protéines Mira et Numb pour les exclure du cortex apical et restreindre leur localisation au pôle basal. Mira phosphorylée va ensuite recruter Brat et Pros au pôle basal (lignage de type I). Numb phosphorylée est quant à elle recrutée par PON qui est préalablement phosphorylée par Polo. En apical, le complexe PAR *via* PAR-3/Baz, va lier Insc qui va à son tour recruter Pins. Pins sert de plateforme liant l'orientation du fuseau avec la polarité. Elle recrute Gai qui lie le complexe à la membrane et recrute également NuMA/Mud et Dlg, impliquées dans l'ancrage et l'orientation du fuseau mitotique en interagissant avec les Mt astraux (voir le texte pour les détails).

Nous avons vu que le rôle d'aPKC est crucial dans ce système. Des publications récentes ont révélé de nouveaux mécanismes de régulation de son activité kinase. Par exemple, la phosphatase PP2A est un régulateur négatif de l'activité d'aPKC dans le complexe PAR. aPKC est en complexe avec Twins (une sous-unité de type B régulatrice de PP2A) et Microtubule Star (Mts, une sous-unité catalytique). PP2A *via* Mts, interagit avec PAR-6 pour réguler de façon précise son niveau de phosphorylation par AurA et contrôler ainsi l'activité d'aPKC par Lgl (Ogawa et al., 2009). De façon intéressante, PP2A a également été montrée comme ayant un rôle important dans la localisation asymétrique d'aPKC dans les Nb. En excluant aPKC du cortex basal, PP2A semble requise pour maintenir aPKC au cortex apical, et joue donc un rôle important dans le processus de division asymétrique (Chabu and Doe, 2009).

Les protéines qui seront héritées par la GMC sont localisées au niveau du cortex basal. Le ciblage de l'une d'entre elles, Mira, à la membrane est assuré par la déphosphorylation de sa thréonine T591 par la « phosphotyrosyl phosphatase activator » (PTPA) associée à PP4/PP4R3/falafel (Sousa-Nunes et al., 2009; Zhang et al., 2016a). Sa restriction au pôle basal est assurée par aPKC et nécessite également l'ubiquitinylation par l'APC/C d'un domaine non identifié dans sa partie C-terminale (Slack et al., 2007). Mira a pour rôle de permettre la localisation des facteurs Pros et « Brain Tumor » (Brat) et leur relargage dans la GMC (Betschinger et al., 2006; Fuerstenberg et al., 1998; Ikeshima-Kataoka et al., 1997; Lee et al., 2006c; Matsuzaki et al., 1998). Pros est un facteur de transcription synthétisé dans le cytoplasme des Nb de type I et est transmis à la GMC lors de la division asymétrique. Il se localise ensuite au noyau de la GMC et permet la mise en place du programme génétique de différenciation. En son absence (mutant), les cellules filles retrouvent un phénotype d'auto-renouvellement et de prolifération (comme c'est le cas pour les INP issus des Nb de type II) (Choksi et al., 2006; Hirata et al., 1995). Brat (Types II), quant à elle, agit comme un suppresseur de tumeur dans le SNC en permettant la différenciation neurale et en régulant l'activité de Notch (décrit un peu plus loin). Les mutants pour Pros et Brat partagent le même phénotype de surprolifération de Nb (Bello et al., 2006; Lee et al., 2006c; Mukherjee et al., 2016).

Un second complexe basal, hérité par la GMC et qui participe également à la différenciation de cette dernière est composé de Numb (un inhibiteur de la voie de signalisation Notch) et de son partenaire nécessaire à sa localisation, « Partner of Numb »

(Pon) (Knoblich et al., 1995; Lu et al., 1998). La localisation de Pon, et donc de Numb, dépend de sa phosphorylation par la kinase Polo dont les niveaux (protéique et activité kinase) sont eux-mêmes contrôlés par l'activité phosphatase de PP2A (PP2A-29B, Mts et Twins) (Wang et al., 2009, 2007). Ainsi, un mutant de Numb phosphomimétique pour quatre sites de phosphorylation par polo entraîne une baisse de son activité et la formation de Nb surnuméraires issus des types II (Ouyang et al., 2011). Dans un autre modèle de cellule souche, les SOP, donnant naissances aux soies sur le dos de la drosophile, Numb intervient également dans la différenciation cellulaire en favorisant l'endocytose du récepteur Notch en faisant le lien entre Notch et l' α -adaptine (Berdnik et al., 2002). Numb est aussi capable d'inhiber la localisation membranaire d'un activateur de Notch, Sanpodo (O'Connor-Giles and Skeath, 2003). Cette régulation par Numb de la voie Notch reste à démontrer dans le cas des Nb.

L'inhibition de la voie Notch est primordiale pour la différenciation des GMC. Notch permet l'expression des facteurs de transcription Deadpan (Dpn) (au moins dans le lignage de type II) et E(spl) dans les Nb (San-Juán and Baonza, 2011; Zacharioudaki et al., 2012). Les auteurs de ces études ont montré que lorsque Notch ou Dpn sont anormalement exprimés (gain de fonction) dans la progénie des Nb, cela entraîne la formation et la prolifération de pseudo-Nb et de la tumorigénèse. Les membres de la famille des E(spl) et un autre facteur de transcription de la voie Notch, Su(h), sont capables de réguler la prolifération des Nb en permettant directement l'activation et l'expression de gènes du cycle cellulaire comme la Cycline E, Cdc25 ou E2F, des gènes de la voie Notch elle-même et un programme proche de celui activé par Ase (Bivik et al., 2016; Zacharioudaki et al., 2016). La perte de Notch dans le lignage de type II entraîne une expression ectopique d'Erm dépendante de PntP1 et cela entraîne la transformation des types II en type similaire aux types I (réexpression d'Ase) en inhibant la fonction de PntP1 (Li et al., 2016).

2. L'orientation du fuseau

Afin de permettre la bonne ségrégation des déterminants d'identité cellulaire dans les deux cellules filles en anaphase, l'orientation du fuseau mitotique selon l'axe de polarité est cruciale dans les Nb en métaphase.

L'orientation du fuseau est contrôlée au pôle apical par la présence d'un complexe composé d'Inscuteable (Insc), Pins et Gai (Kraut et al., 1996; Schaefer et al., 2000; Yu et al.,

2000). La localisation de ce complexe requiert le complexe PAR. Baz recrute la protéine adaptatrice Insc et se lie à Pins/Gai pour former le complexe final (Schaefer et al., 2000; Schober et al., 1999; Wodarz et al., 1999; Yu et al., 2000). Pins est d'abord dans un état inactif dans lequel deux de ses domaines sont liés et s'auto-inhibent, les domaines TPR et « Gai/o-LoCo interaction » (GoLoco) en C-terminal. La liaison de Gai sur les répétitions GoLoco permet l'activation de Pins en rendant disponible le domaine TPR. Le complexe Pins/Gai actif peut alors jouer son rôle dans le recrutement de NuMA/Mud par sa liaison au domaine TPR libre (Bowman et al., 2006; Izumi et al., 2006; Nipper et al., 2007; Siller et al., 2006). NuMA/Mud influe directement sur l'orientation du fuseau en liant les Mt et en interagissant, probablement, avec la Dynéine (Bowman et al., 2006; Merdes et al., 1996; Siller et al., 2006).

Cette liaison avec la Dynéine va permettre la génération d'une force permettant une réorientation rapide du fuseau mitotique. Le tropisme vers les extrémités « moins » des Mt de la Dynéine crée une force de traction attirant le fuseau vers la région du cortex où est ancrée Pins associé avec NuMA/Mud. Dans les mutants NuMA/Mud, la polarité corticale est totalement normale mais les fuseaux s'orientent mal dans l'axe de polarité, montrant ainsi que NuMA/Mud est nécessaire pour lier l'orientation du fuseau et l'axe de polarité (Siller et al., 2006). La localisation de NuMA/Mud est également permise grâce à l'interaction avec les protéines centrosomales « anastral spindle 2 » (Ana2) et « cut up » (Ctp) une protéine de la chaîne légère de la Dynéine. Ana2 et Ctp localisent NuMA/Mud au centrosome et au cortex et facilitent/maintiennent son interaction avec Pins (Wang et al., 2011). Il existe une seconde voie distincte en aval de Pins pour orienter le fuseau. Dlg lie Pins et cette liaison est dépendante de la phosphorylation de Pins par AurA. Ensuite, Dlg interagit avec la kinésine Khc73 (une protéine motrice dirigée vers les extrémités « + » des Mt) qui va « capturer » des Mt astraux. Cependant, ce mécanisme a été étudié dans des cellules S2 de *D. melanogaster* « artificiellement polarisées » et ces résultats sont encore à confirmer dans le Nb *in vivo* (Johnston et al., 2009; Siegrist and Doe, 2005). Il existe donc une association entre un mécanisme de traction et un mécanisme de capture pour la bonne orientation du fuseau (Lu and Johnston, 2013) et l'implication du complexe Pins/Gai permet de relier la polarité apico-basale à l'orientation du fuseau.

Récemment, une étude est venue apporter de nouveaux éléments pour le contrôle de l'orientation du fuseau mitotique. La protéine « ADP ribosylation factor like 2 » (Arl2), en

interagissant avec le cofacteur de liaison de la tubuline « Tubulin-specific chaperone D » (TBCD), contrôle la croissance des Mt, la localisation de Msp5 et D-TACC et l'auto renouvellement des Nb. La perte d'Arl2 entraîne un défaut d'asymétrie de division et sa surexpression conduit à la perte des Nb (Chen et al., 2016).

Les centrosomes sont également importants pour l'orientation du fuseau en métaphase. Dans des Nb mutants pour deux protéines essentielles du centrosome, Cnn ou Sas-4, le fuseau parvient à se former mais ne parvient pas à s'aligner correctement dans l'axe de polarité, entraînant ainsi des défauts de ségrégation des déterminants corticaux (Basto et al., 2006; Megraw et al., 2001). La biologie des deux centrosomes du Nb est différente, ce qui peut expliquer leur implication dans le maintien de l'axe de polarité. En interphase, lorsque les deux centrioles se séparent, un seul reste actif au pôle apical (le centrosome-fils), il conserve son PCM et sera hérité par le futur Nb. L'autre (le centrosome-père), perd son PCM et commence à migrer vers le pôle opposé avant de s'activer de nouveau. Il sera hérité par la GMC (Rebollo et al., 2007; Rusan and Peifer, 2007). Cette asymétrie de distribution des centrosomes père et fils est particulière au Nb car dans les cellules souches de la lignée germinale mâle par exemple, c'est le vieux centriole père qui est retenu dans la cellule souche alors que dans le Nb, c'est le jeune centrosome fils (Januschke et al., 2011; Yamashita et al., 2007). Le maintien du PCM dans le centriole fils requiert la protéine Asterless (Asl) (Varmark et al., 2007). Ce maintien est également dû à une régulation différente de l'incorporation de la Centrosomine (Cnn) (Conduit and Raff, 2010). Peu après leur séparation, les deux centrioles organisent du PCM mais l'incorporation de Cnn est inhibée dans le centrosome père (qui perd alors son PCM) alors qu'il est maintenu dans le centrosome fils. Cela permet au fils de maintenir sa position apicale en maintenant le contact au cortex via son réseau de Mt astraux. La Centrobine (Cnb), phosphorylée par Polo, participe aussi au maintien du PCM et semble interagir avec la γ -Tub, Cnn, Ana2, Sas-4 et Asl (Januschke et al., 2013). Au centrosome père, la présence de « Pericentrin-like protein » (Plp) agit comme un régulateur négatif de la maturation en bloquant le recrutement de Polo (Lerit and Rusan, 2013). La protéine WDR62 est également requise pour le maintien de l'asymétrie des centrosomes en interphase. WDR62 maintient le centrosome fils actif en stabilisant les Mt et en permettant ainsi le recrutement de Polo au PCM et la sous-régulation de Plp. La perte de l'activité du centrosome fils dans les mutants WDR62 compromet la position des centrosomes et rend leur ségrégation aléatoire (Ramdas Nair et al., 2016). Il a été montré en 2010 que l'ancrage du centrosome fils au pôle apical et son pouvoir de nucléation est important dans le

maintien de la mémoire de l'axe de division au cours des divisions consécutives des Nb (Januschke and Gonzalez, 2010). Les auteurs ont montré qu'une dépolymérisation transitoire des Mt de ce centrosome entraîne son décrochage du pôle apical et lorsque la nucléation est de nouveau permise, ce dernier s'ancre de manière aléatoire au cortex, dictant par la même un nouvel axe de polarité propagé au cours des divisions suivantes. Le réseau de Mt nucléés à partir du centrosome fils et son ancrage semble donc nécessaire au maintien de l'axe de polarité au cours des divisions.

C. Nb homéostasie et tumorigénèse

Comme nous venons de le voir, le Nb est une cellule polarisée et l'orientation du fuseau mitotique selon un axe apico-basal est crucial pour la bonne ségrégation des déterminants d'identité cellulaire. Les déterminants Brat, Pros et Numb qui se localisent au cortex basal sont hérités par la GMC (ou seulement Brat et Numb pour les INP). Leur rôle est de bloquer l'expression des gènes spécifiques aux Nb afin d'assurer la différenciation/maturation cellulaire. Leur ségrégation différentielle est importante car une mutation dans l'un de ces gènes ou la mauvaise répartition de ces protéines entraîne une surprolifération des Nb et une tumorigénèse dans le cerveau (Bello et al., 2006; Betschinger et al., 2006; Bowman et al., 2008; Lee et al., 2006a, 2006c; Wang et al., 2006). Il semble que la surprolifération des Nb observée dans ces mutants soit surtout due à une amplification du lignage de type II, probablement à cause de la présence des INP qui mûrent mal et se comportent comme des pseudo-Nb (Bowman et al., 2008). Cabernard et Doe ont démontré que le ratio entre les déterminants basaux et apicaux est important pour spécifier le destin des cellules filles et contrôler leur prolifération. La présence de tous les déterminant basaux dans une seule cellule (division à 45° par rapport à l'axe de polarité) en présence des déterminants apicaux ne suffit pas à engager la différenciation. Seule la surexpression de Pros en est capable en permettant la répression des gènes de prolifération (Cabernard and Doe, 2009). Le pouvoir tumorigène de mutants de déterminants d'identité cellulaire permettant l'asymétrie de division a été testé par allogreffe de cerveaux larvaires mutants dans l'abdomen d'adultes sains (Caussinus and Gonzalez, 2005). Les auteurs ont mis en évidence que ces mutants (*brat*, *mira*, *pros*...) sont capables d'entraîner la formation de tumeurs immortelles (re-implantable au moins 2 ans) chez l'hôte avec un maximum de 98% de tumeurs développées pour le

mutant *brat*. Ils ont également observé l'apparition d'instabilité génomique et d'aneuploïdie corrélée avec l'augmentation du pouvoir tumorigène des transplants.

Ces résultats laissent penser que, contrairement à ce que nous avons vu dans le chapitre précédant, les tumeurs induites dans le CNS à partir des Nb ne sont pas dues à l'aneuploïdie mais bien à un défaut dans l'asymétrie de division. Cela a été vérifié par Castellanos et collaborateurs qui ont montré que les mutations entraînant une instabilité génomique, sans perte de la polarité de la division, n'entraînent pas de formation tumorale (Castellanos et al., 2008). En corrélation avec ces résultats, il a également récemment été démontré que l'aneuploïdie dans les Nb entraîne leur différenciation prématurée par une entrée dans une phase G1 étendue et leur sortie du cycle cellulaire. Ce mécanisme permet d'éviter une surprolifération des Nb (Gogendeau et al., 2015). L'aneuploïdie dans les tumeurs issues d'une surprolifération des Nb est donc une conséquence de la tumorigénèse et non une cause.

V. Objectifs de thèse

Aujourd'hui, la relation entre aneuploïdie et tumorigénèse est toujours sujette à débat. Il est couramment admis qu'une faible aneuploïdie participe au processus de tumorigénèse, sans que l'on sache vraiment si elle en est une cause ou une conséquence. En revanche, une forte aneuploïdie est létale pour les cellules tumorales humaine en culture (Janssen et al., 2009, 2011; Silk et al., 2013).

Janssen et collaborateurs (Janssen et al., 2009, 2011) proposent comme stratégie anti-cancéreuse, l'élévation de l'aneuploïdie dans les cellules tumorales pour les pousser vers la voie apoptotique. Cependant, cette hypothèse n'a été testée (et validée) que sur des cellules en culture. Durant ma thèse, Silk et collaborateurs ont démontré que l'induction d'une forte instabilité chromosomique par la réduction de CENP-E et Mad2 (donc du SAC) chez la souris entraîne une suppression des tumeurs (par mort cellulaire) normalement induite par la réduction de CENP-E seule suggérant que cette stratégie est également envisageable *in vivo*.

L'objectif de mes travaux de thèse a été de tester si l'induction d'une forte aneuploïdie dans le SNC de la drosophile pouvait supprimer les tumeurs issues d'une surprolifération des Nb. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser deux mutants, *sas-4* et *aurA*, qui entraînent la formation de tumeurs qui présentent des Nb surnuméraires et un défaut d'assemblage du fuseau mitotique détecté par le SAC. Afin de générer de l'aneuploïdie dans ces tumeurs, nous avons décidé de combiner ces lignées mutantes avec une lignée mutante pour Mad2, protéine essentielle pour le SAC, et qui ne présente donc pas de SAC actif. L'utilisation de ces doubles mutants doit nous permettre d'analyser des Nb dans lesquels les défauts d'assemblage des fuseaux mitotiques ne sont plus détectés ni corrigés, ce qui devrait entraîner une sortie de mitose prématurée avec une mauvaise ségrégation des chromosomes et donc l'induction d'une forte aneuploïdie.

Mes travaux ont permis de mettre en évidence que l'induction d'une forte aneuploïdie dans le mutant *sas-4* compromet effectivement la prolifération cellulaire et la tumorigénèse. En revanche, de manière très surprenante, pour le mutant *aurA*, la perte du SAC n'entraîne pas de baisse de la prolifération ni d'aneuploïdie. J'ai montré que dans ce mutant, la satisfaction du SAC n'est pas couplée avec l'entrée en anaphase à cause d'un défaut dans la

cinétique de dégradation de la CycB. Les mutants *aurA* présentent ainsi un délai en mitose et une ségrégation normale des chromosomes de manière indépendante du SAC.

Résultats

Analyse de la prolifération cellulaire et de l'aneuploïdie dans les mutants *sas-4* et *aurA* chez *Drosophila melanogaster*

A. Résumé

Une surprolifération cellulaire associée à de l'aneuploïdie est un marqueur couramment retrouvé dans les cancers et une faible instabilité génétique peut-être un élément aggravant (sinon déclencheur) de la tumorigénèse (Duijf and Benezra, 2013). Récemment, il a été montré sur un modèle de cellules cancéreuses en culture qu'une forte aneuploïdie compromet la prolifération cellulaire en entraînant la mort de ces dernières. Au cours de ma thèse, nous avons souhaité tester si cette hypothèse se vérifiait *in vivo* en utilisant comme modèle, les tumeurs du système nerveux central de la larve de *D. melanogaster*. Nous avons fait le choix d'utiliser des mutants pour des gènes impliqués dans la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes (*Sas-4* ou *AurA*) afin d'induire ces tumeurs. Pour générer l'aneuploïdie, nous avons choisi d'associer les mutations *sas-4* ou *aurA* avec des mutations pour des gènes essentiels du SAC, *Mad2* ou *BubR1^{ken}*. Nous avons ensuite analysé par immunofluorescence et microscopie l'effet de la perte du SAC sur la prolifération des Nb.

Pour *sas-4*, la perte du SAC cause l'apparition d'une forte aneuploïdie et une baisse du nombre de Nb associée à une forte réduction de taille des cerveaux. Cela compromet totalement la capacité des cerveaux mutants à induire des tumeurs lorsqu'on les injecte dans l'abdomen de mouches adultes saines. Dans le cas d'*aurA*, ni hausse de l'aneuploïdie dans le tissu ni baisse de la prolifération des Nbs n'ont été observés. Par ailleurs, la même forte proportion de mouches injectées avec des cerveaux *aurA* ou *aurA mad2* développant une tumeur a été constaté. Afin de mieux comprendre pourquoi le mutant *aurA* ne réagit pas comme le mutant *sas-4* à la déplétion du SAC, nous avons entrepris une analyse détaillée des mutants *aurA* et *aurA mad2*. Nous avons d'abord observé que, malgré la perte du SAC, 1) il existe toujours un délai en mitose dans *aurA mad2* et 2) il existe un délai entre la satisfaction du SAC et l'entrée en anaphase dans *aurA*. Comme l'entrée en anaphase est dépendante de la dégradation de la CycB et de la Sécurine *via* l'APC/C, nous avons analysé le comportement de la CycB (couplé à une étiquette GFP) par vidéo-microscopie en temps réel et observé un défaut de la régulation de la dégradation de cette dernière dans le mutant *aurA* ainsi que dans

le double mutant *aurA mad2*. Ces observations nous ont permis de proposer un nouveau rôle pour la kinase AurA dans la régulation de la dégradation de la CycB en fin de mitose.

B. L'article : « Spindle assembly checkpoint inactivation fails to suppress neuroblast tumour formation in *aurA* mutant *Drosophila* »

ARTICLE

Received 2 Mar 2015 | Accepted 10 Oct 2015 | Published 16 Nov 2015

DOI: 10.1038/ncomms9879

OPEN

Spindle assembly checkpoint inactivation fails to suppress neuroblast tumour formation in *aurA* mutant *Drosophila*

Renaud Caous¹, Aude Pascal¹, Pierre Romé^{1,†}, Laurent Richard-Parpaillon¹, Roger Karess² & Régis Giet¹

Tissue homeostasis requires accurate control of cell proliferation, differentiation and chromosome segregation. *Drosophila sas-4* and *aurA* mutants present brain tumours with extra neuroblasts (NBs), defective mitotic spindle assembly and delayed mitosis due to activation of the spindle assembly checkpoint (SAC). Here we inactivate the SAC in *aurA* and *sas-4* mutants to determine whether the generation of aneuploidy compromises NB proliferation. Inactivation of the SAC in the *sas-4* mutant impairs NB proliferation and disrupts euploidy. By contrast, disrupting the SAC in the *aurA* mutant does not prevent NB amplification, tumour formation or chromosome segregation. The monitoring of Mad2 and cyclin B dynamics in live *aurA* NBs reveals that SAC satisfaction is not coupled to cyclin B degradation. Thus, the NBs of *aurA* mutants present delayed mitosis, with accurate chromosome segregation occurring in a SAC-independent manner. We report here the existence of an Aurora A-dependent mechanism promoting efficient, timed cyclin B degradation.

¹Institut de Génétique et Développement de Rennes-Université de Rennes I-CNRS- UMR 6290, 2 avenue du Pr Léon Bernard, 35043 Rennes, France.

²Institut Jacques Monod-Université Paris Diderot-Paris 7, 15 rue Hélène Brion, 75205 Paris, France. † Present address: The Wellcome Trust Centre for Cell Biology, School of Biological Sciences, University of Edinburgh, Michael Swann Building, Max Born Crescent, Edinburgh EH9 3BF, UK. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.G. (email: regis.giet@univ-rennes1.fr).

The mitotic spindle is a microtubule-based structure involved in the segregation of the two sets of duplicated chromosomes in the two daughter cells. In polarized fly neural stem cells (neuroblasts (NBs)), it is also involved in the differential segregation of cell fate determinants anchored to the apical and basal cell cortex. In this type of cell division, the two daughter cells have different fates: one retains NB identity and continues to proliferate, whereas the other differentiates. Defects in spindle orientation lead to the abnormal delivery of cell fate determinants. Consequently, both daughter cells may become NBs, leading to tumour formation^{1–3}. This is the case for *sas-4* mutant flies, which have no centrosomes and display severe spindle orientation defects^{4,5}. Spindle orientation and assembly are therefore tightly linked in the maintenance of tissue homeostasis and euploidy in the fly central nervous system (CNS). An understanding of the mechanisms involved in the defective asymmetric division of NBs is therefore relevant to cancer stem cell research¹.

Aurora A kinase has been implicated in the formation of human cancers and is considered to be an oncogene⁶. Paradoxically, *Drosophila* Aurora A can also act as a tumour suppressor during the asymmetric division of NBs^{7–9}. Mutations of *Drosophila aurA* result in the production of abnormal mitotic spindles with defective astral microtubule attachments to the apical cortex, leading to spindle misorientation, abnormal daughter cell fate acquisition and expansion of the NB population^{7–11}. The transplantation of mutant *aurA* brains into the abdomens of host flies leads to tumour formation⁵. The spindle defects of *aurA* mutant NBs also lead to delays in mitotic progression. Wild-type NBs exit mitosis ~6–7 min after nuclear envelope breakdown (NEBD), whereas *aurA* hypomorphic mutant neuroblasts do not exit mitosis until ~20 min after NEBD. This delay is presumably mediated by prolonged spindle assembly checkpoint (SAC) activation in response to incorrectly attached kinetochores^{4,7,12}.

In human cancer cells, weakening of the SAC compromises chromosome segregation and leads to massive aneuploidy and cell death¹³. We show here that the absence of the SAC in *sas-4* mutants strongly impairs chromosome segregation, euploidy and the ability of neural tissues to proliferate and to induce tumours. However, chromosome segregation and cell ploidy are unaffected by the absence of the SAC in *aurA* mutants, and the mutant tissue can still induce tumours following their injection into host flies. Our results suggest that impaired cyclin B degradation compensates for the defect in chromosome segregation in *aurA* neural tissues, in the absence of the SAC.

Results

SAC inactivation does not impair *aurA* NB amplification. We investigated the effects on fly viability and brain development of an absence of the SAC in *aurA*⁸⁸³⁹ null flies (hereafter referred as *aurA*). Mad2 is a key component of the SAC apparatus and appears to have no other role in *Drosophila*¹⁴.

We therefore created various double-mutant lines for *aurA*⁸⁸³⁹ and *mad2*, and checked the double mutation by confirming that the Mad2 protein was absent and that there was a higher mobility form of the truncated AurA^{K377/stop} mutant protein (Fig. 2c, second panel from the top). We confirmed that the null *mad2*^P mutant (hereafter referred to as *mad2*) was viable^{4,14}. In *mad2* larval brains, the number of NBs (\pm s.d.) (73.2 ± 9.0 NBs per lobe, $n = 22$) was similar to that in the wild type (75.4 ± 10.5 NBs per lobe, $n = 14$) (Fig. 1a left panels and b).

Surprisingly, the *aurA mad2* double mutant displayed marked brain overgrowth, similar to that observed for *aurA* mutants (Supplementary Fig. 5a). Consistent with the overgrowth

phenotype, the larval brains of both *aurA* and *aurA mad2* individuals had more NBs per lobe than the WT (Fig. 1a right panels and c). We labelled larval brain tissues of single- and double-mutant brains with H2A-green fluorescent protein (GFP), dissected them and injected them into host flies to assess their ability to induce tumour formation¹⁵. Tumour formation rates were similar for *aurA mad2* double-mutant brains (~80%, 45/56 injected flies, Fig. 1e) and for *aurA* single-mutant brains (82%, 41/50). By contrast, neither WT nor *mad2* mutant brains triggered tumour formation, consistent with published findings⁵. We confirmed these results with another *aurA* allelic combination (*aurA*^{8839/aurA}¹⁷⁹⁶¹), and with a *bubR1* allele causing a defective SAC (hereafter named *bubR1-KEN* (ref. 16)). Like *aurA mad2* brain tissues, *bubR1-KEN aurA*^{8839/aurA}¹⁷⁹⁶¹ brains were bigger than WT, contained large numbers of NBs and had high mitotic indices (Supplementary Fig. 1).

We investigated whether the ability of *aurA* neural tissues to develop tumours even in the absence of a SAC was a general feature of mutants generating supernumerary NBs, by studying the consequences of inactivating the SAC in *sas-4* mutants. The spindles of *sas-4* mutants lack centrioles and astral microtubules, and they display alignment defects similar to those seen in *aurA* mutants^{4,10,17} (Fig. 1d). In *sas-4* NBs, spindles assemble from microtubules that have randomly nucleated around chromatin, and the duration of mitosis is prolonged by 30–40%, presumably due to the action of the SAC⁴. Thus, while *sas-4* mutants display very low levels of aneuploidy, their spindle orientation is defective and their brains can generate tumours on transplantation⁵.

We confirmed that the *sas-4*²²¹⁴ mutant (hereafter referred to as *sas-4*) was viable^{4,14}. The brains of *sas-4* mutants contained about 70% more NBs than WT brains (126.2 ± 16.2 per lobe, $n = 18$, $P = 7.9 \times 10^{-8}$, Wilcoxon test), consistent with their ability to develop into tumours when injected into host flies⁵ (Fig. 1f). However, double-mutant *sas-4 mad2* individuals had much smaller brains, with far fewer NBs (42.0 ± 14.5 NBs per lobe, $n = 14$; Fig. 1a,b), and their brain tissues did not form tumours after injection into host flies (Fig. 1f). In addition, dividing NBs were only very rarely observed in the double mutants, and almost all these cells had abnormal spindle structures (Fig. 1d). Similarly, a *bubR1-KEN sas-4* double mutant was found to have impaired tissue growth and smaller than normal numbers of NBs (Supplementary Fig. 2a,b).

High mitotic indices and normal ploidy in *aurA mad2* brains.

Inactivation of the SAC in *sas-4* mutants severely impaired brain development and triggered spindle assembly failure, whereas such inactivation had little effect in *aurA* mutants. The growth defects in the *sas-4 mad2* mutant were associated with the presence of numerous aneuploid (42.6%) and polyploid (35.5%) cells. By contrast, the rates of aneuploidy and polyploidy were only slightly increased by SAC ablation in *aurA* mutants (Supplementary Fig. 3). These opposite results for *sas-4* and *aurA* mutant NBs suggest that a specific mechanism operates in *aurA* mutant NBs (but not in *sas-4* mutant NBs), allowing correct chromosome segregation to occur even if the SAC is not functional.

The larval brains of *aurA* mutant individuals have a high mitotic index (6.7%, versus about 1% in the WT)¹¹ (Fig. 2a). This high mitotic index is presumably due to the intervention of the SAC, because *aurA* mutant spindle assembly is defective. Surprisingly, however, *aurA mad2* double mutants had a mitotic index of $5.8 \pm 2.8\%$, very similar to that of *aurA* brains (Fig. 2a). As described previously, *aurA* mitotic NBs divide symmetrically to generate smaller NBs⁷. In addition, the mitotic cells of both *aurA* and *aurA mad2* individuals presented highly

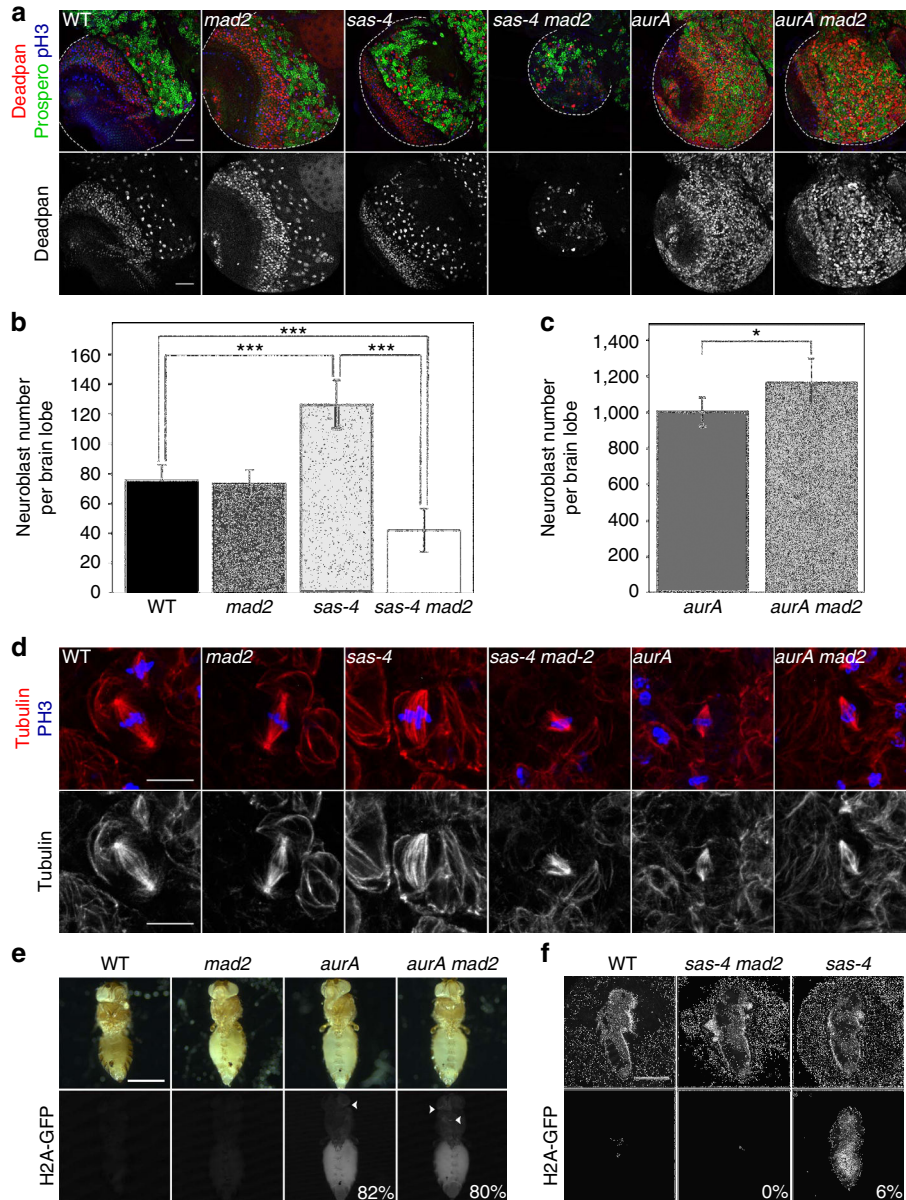


Figure 1 | SAC deletion prevents the amplification of *sas-4* mutant NBs but not of *aurA* mutant NBs. (a) Examination of WT, *sas-4*, *aurA*, *mad2*, *sas-4 mad2* and *aurA mad2* mutant brain development. WT and *mad2* mutant brains grew normally, whereas *sas-4* and *aurA* mutant brains contained large numbers of NBs. SAC deletion impaired brain development in combination with *sas-4*, but not with *aurA*. The pan-NBs were counted by staining of the central brain region with an anti-deadpan antibody (red and lower monochrome panels). Staining for the neuronal marker prospero is shown in green. Staining for phosphorylated histone H3 (Ser10) is shown in blue. Scale bar, 50 μ m. (b) Quantification of pan-NBs (\pm s.d.) in WT, *sas-4*, *mad2* and *sas-4 mad2* brain lobes. WT and *mad2* brain lobes had 75.4 ± 10.5 NBs per lobe ($n = 14$) and 73.2 ± 9.0 NBs per lobe ($n = 22$), respectively. *sas-4* lobes contained a larger number of NBs per lobe (126.2 ± 16.2 NBs; $n = 18$). The disruption of Mad2 in a *sas-4* background decreased the growth rate and number of NBs (42.0 ± 14.5 , $n = 14$). $***P < 10^{-10}$ (Wilcoxon test). (c) Quantification of pan-NBs (\pm s.d.) in *aurA* and *aurA mad2* brain lobes. The number of NBs in *aurA* brain lobes (1003.6 ± 79.7 , $n = 12$) was high, even in the absence of Mad2 (1164.2 ± 134.3 , $n = 11$). $*P < 3 \times 10^{-3}$ (Wilcoxon test). (d) SAC deletion compromises spindle morphology in *sas-4* but not *aurA* mutant NBs. Metaphase NBs from the indicated genotypes were stained for phosphorylated histone H3 (Ser10) (blue), tubulin (red and lower panels in monochrome). Many spindles in *sas-4* brains were bipolar, but *sas-4 mad2* mutant spindles were abnormal in shape. The *aurA* and *aurA mad2* mutants had short bipolar spindles. Scale bar, 10 μ m. (e) The ability of *aurA* mutant brains to develop tumours is not compromised by SAC deletion. WT, *aurA*, *mad2* and *aurA mad2* brains were labelled with H2A-GFP and transplanted into host flies to assess their tumorigenic potential¹⁵. The transplantation of *aurA* and *aurA mad2* brain tissues induced tumour formation in 82% (41/50) and 80% (45/56) of cases. (f) The transplantation of H2A-GFP-labelled *sas-4* brain tissues led to tumour formation (5.9%, 6/102) whereas the transplantation of *sas-4 mad2* brain tissues did not (0%, 0/112). Scale bar, 0.5 mm.

condensed chromosomes with preserved centromeric cohesion (Fig. 2b), a feature characteristic of a prolonged M phase¹⁸. Cyclin A protein levels were normal (Fig. 2c, right) and this protein was degraded normally, during prometaphase, in all genotypes

examined (Fig. 2d). However, phosphorylated histone (phospho-histone) H3 (Ser10) and cyclin B protein levels were higher in *aurA mad2* and *aurA* brain extracts than in WT or *mad2* extracts (Fig. 2c, left). Analyses of fixed specimens from

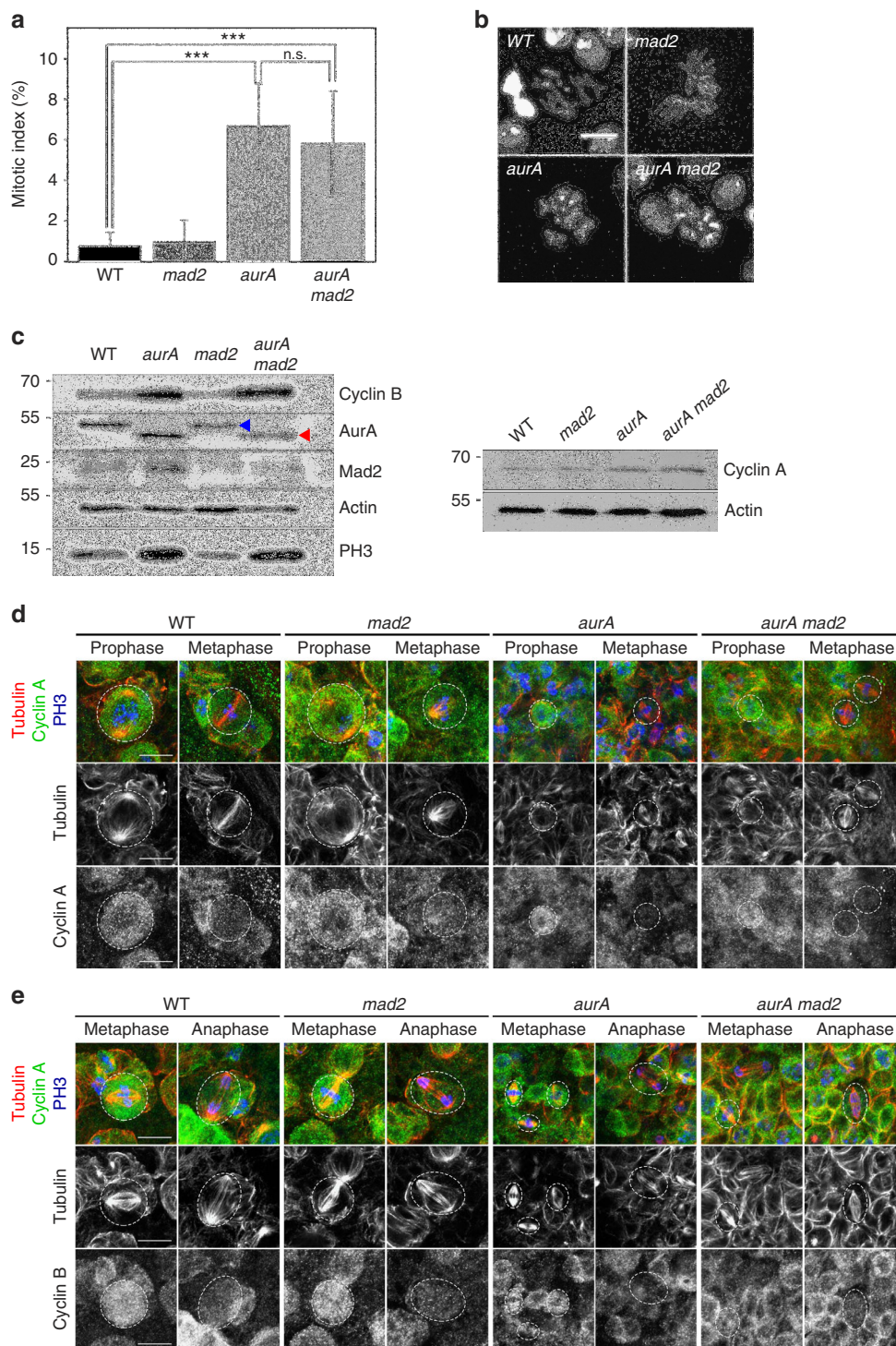


Figure 2 | Mitotic delay in *aurA* mutants is SAC independent. (a) Analysis of mitotic indices (\pm s.d.) in WT, *mad2*, *aurA* and *aurA mad2* neural tissues. WT: $0.73 \pm 0.69\%$ ($n = 11,332$, three brains); *mad2*: $0.96 \pm 1.07\%$ ($n = 9,507$, three brains); *aurA*: $6.7 \pm 2.1\%$ ($n = 11,334$, three brains); and *aurA mad2*: $5.8 \pm 2.8\%$ ($n = 8,648$, three brains). $***P < 10^{-10}$ (Wilcoxon test). (b) Chromosome morphology in WT, *mad2*, *aurA* and *aurA mad2* neural tissues. Note that in both *aurA* (bottom left) and *aurA mad2* (bottom right) mutants, the mitotic cells have highly condensed chromosomes, indicative of a delay in mitosis, unlike WT and *mad2* mutant brain cells (top). Scale bar, 10 μ m. (c) Western blots showing the levels of cyclin B, AurA, Mad2, phospho-histone H3 (Ser10) (left) and cyclin A (right). Actin was used as a loading control. Cyclin B and phospho-histone H3 (Ser10) are high in *aurA* and *aurA mad2* neural tissue extracts, whereas cyclin A protein levels are not. The truncated AurA^{K377/STOP} corresponding to the *aurA*⁸⁸³⁹ mutation is detected as a higher mobility protein in the corresponding *aurA* and *aurA mad2* brain extracts (red triangle), whereas the endogenous Aurora A is indicated by the blue triangle. (d) Cyclin A degradation occurs during prometaphase in WT, *mad2*, *aurA* and *aurA mad2* mitotic cells. WT and mutant brains of the indicated genotypes were fixed and stained for cyclin A (green and lower monochrome panels) during G2 and prometaphase. Microtubules are labelled in red (and on the middle monochrome panels) and phospho-histone H3 (Ser10) is displayed in blue. (e) Cyclin B degradation occurs at the metaphase to anaphase transition in WT, *mad2*, *aurA* and *aurA mad2* mutant brains. Brains were fixed and stained for cyclin B (green and lower monochrome panels), tubulin (red and middle monochrome panels) and phospho-histone H3 (Ser10). Scale bar, 10 μ m.

aurA and *aurA mad2* mutants confirmed the high frequency of mitotic cells labelled for phospho-histone H3 (Ser10) and cyclin B. However, cyclin B was ultimately degraded in all anaphase cells examined, for both genotypes ($n > 20$; Fig. 2e). Finally, we observed no lagging chromosomes during anaphase and telophase in fixed preparations of tissues from *aurA* and *aurA mad2* mutants ($n > 40$). These findings suggest that mitotic exit and cyclin B degradation were delayed in a SAC-independent manner in *aurA mad2* mutant NBs, and that this delay was sufficient to allow correct attachment of the chromosomes to the spindle before the onset of anaphase.

A delay between SAC satisfaction and anaphase in *aurA* NBs.

We characterized this unexpected phenotype further by assessing SAC activation by following GFP-Mad2 recruitment and the timing of cyclin B degradation in live *aurA* mutant NBs. The mitotic delay was very long (~ 60 min) for the *aurA*⁸⁸³⁹ allele. We therefore also used a combination of less severe alleles (*aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹) (ref. 7), making it possible to minimize the bleaching of red fluorescent protein (RFP)-Histone H2A and GFP-tagged proteins during the time course of the experiments (Fig. 3a,b). In WT NBs, GFP-Mad2 labelled the nuclear envelope and nucleoplasm before mitosis, and weak fluorescence was observed at the kinetochores during prometaphase (Fig. 3d and Supplementary Movie 1), consistent with previous findings^{19,20}. In all WT cells examined, this weak GFP-Mad2 signal at the kinetochores completely disappeared 1.76 ± 0.85 min ($n = 55$) before anaphase onset (Fig. 3c). In *aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹ mutant NBs, GFP-Mad2 strongly labelled the kinetochores, consistent with defective kinetochore-microtubule attachment and strong SAC activation (Fig. 3a,b,e and Supplementary Movie 2). This strong GFP-Mad2 kinetochore signal decreased slowly in intensity as the chromosomes congressed to the metaphase plate, indicating a delay in the establishment of correct kinetochore-microtubule attachments (Fig. 3e, top and Supplementary Movie 2). However, the time lag between the disappearance of GFP-Mad2 from the kinetochores and the onset of anaphase was significantly longer (5.75 ± 1.88 min, $n = 22$) in all dividing *aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹ cells than in WT cells (Fig. 3c).

Cyclin B degradation is impaired in *aurA* mutant NBs. Anaphase onset is directly connected to anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) activation and the degradation of mitotic targets, including cyclin B and securin, therefore we monitored cyclin B-GFP degradation in *aurA* and *aurA mad2* mutants. Consistent with previous findings, cyclin B-GFP accumulated at the centrosome and in the nucleus of WT NBs before entry into mitosis. Following NEBD, cyclin B-GFP was visible throughout the cell, but the fluorescence was particularly intense

in the kinetochore region and mitotic spindle^{19,21} (Fig. 4a and Supplementary Movie 3). The cyclin B-GFP signal began to disappear abruptly, shortly after the last chromosome reached the metaphase plate, and half the cyclin B-GFP present was degraded 4.75 ± 1.04 min ($n = 18$) after metaphase plate formation (Fig. 4e). The cells of the *aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹ mutant took 11.3 ± 3.5 min ($n = 23$) to degrade half their cyclin B (Fig. 4b,e and Supplementary Movie 4), whereas *aurA* null mitotic cells took 46.2 ± 12.6 min ($n = 12$; Fig. 4d,e and Supplementary Movie 6). The introduction of the *mad2* mutation in the *aurA* null mutant shortened the time required for half the cyclin B to be degraded to 23.2 ± 8.9 min ($n = 17$) but did not restore the WT timing of mitosis (Fig. 4c,e and Supplementary Movie 5). Consistent with observations in fixed anaphase specimens, live imaging of *aurA* and *aurA mad2* mutant cells showed no lagging/delayed chromatids during anaphase that might have resulted from incorrect attachment^{16,22}. This suggests that the machinery responsible for correcting inappropriate attachments between kinetochores and spindle microtubules is fully functional. As cells with Aurora A defects display delayed mitosis, we investigated whether AurA overexpression could accelerate mitosis, as in some cancer cell lines²³. However, we found that mitotic timing was normal under normal conditions in NBs overexpressing Aurora A kinase, with no acceleration (Supplementary Fig. 4). Furthermore, these NBs remained arrested in M phase in the presence of microtubule depolymerizing drugs (unpublished observations).

***aurA* mutation restores the euploidy of *sas-4 mad2* brains.** Our results suggest that *aurA* mutant NBs display defective cyclin B degradation, resulting in a SAC-independent delay of mitosis. If this is indeed the case, then introducing the *aurA* mutation in a *sas-4 mad2* background should (to some extent) restore mitotic timing and euploidy (by lengthening the M phase and correcting the defective kinetochore/microtubule attachments). Consistent with this hypothesis, we found that the mitotic index increased from 0.6% in the *sas-4 mad2* mutant to 4.7% in the *aurA sas-4 mad2* triple mutant (Supplementary Fig. 5d). In addition, only 21.9% of the cells had the correct number of chromosomes in *sas-4 mad2* double mutants, whereas most of the mitotic *aurA sas-4 mad2* cells (63.9%) displayed normal ploidy (Supplementary Fig. 3c). Furthermore, brain overgrowth and NB amplification were also detected in this triple-mutant background (Supplementary Fig. 5a–c).

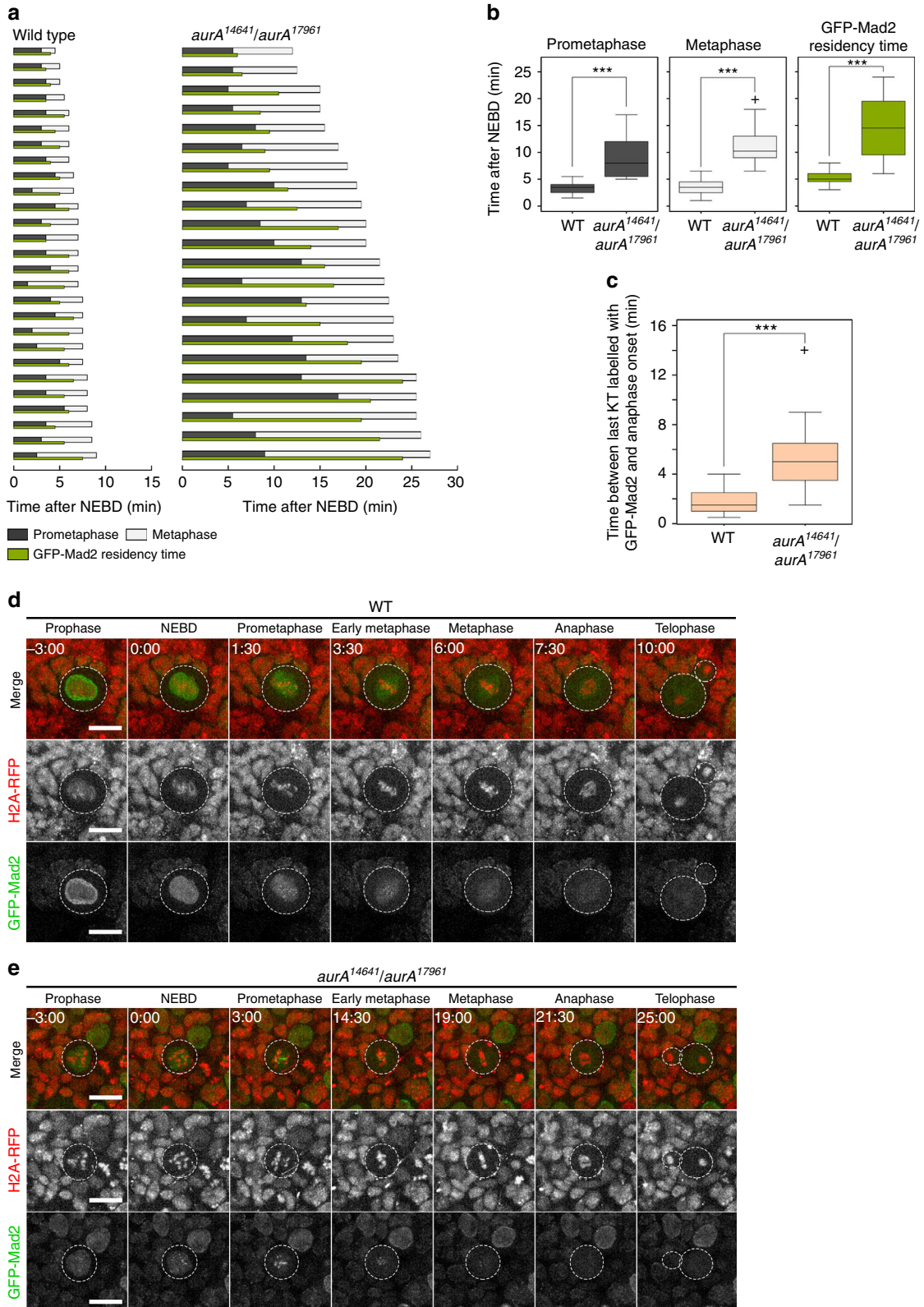
Discussion

This report suggests that Aurora A may be required for the correct APC/C-dependent degradation of cyclin B. The SAC is transiently activated in *aurA* mutants (as shown by the strong recruitment of GFP-Mad2 to kinetochores), but this is not

Figure 3 | Metaphase to anaphase transition is delayed in *aurA* hypomorphic mutant NBs. (a) Mitotic timing and spindle assembly checkpoint analysis in 26 WT (left) and 22 *aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹ NBs (right). The grey and white bars indicate the time spent by each cell in prometaphase and metaphase, respectively. The green bar indicates the time for which GFP-Mad2 was present at the kinetochores. (b) Box plots showing prometaphase duration (left, WT: 3.27 ± 0.93 min; *aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹: 8.81 ± 3.42 min; $P = 1.2 \times 10^{-11}$, Wilcoxon test), metaphase duration (middle, WT: 3.7 ± 1.3 min; *aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹: 11.6 ± 3.8 min; $P = 1.0 \times 10^{-11}$, Wilcoxon test) and Mad2 occupancy time at the kinetochore (right, WT: 5.2 ± 1.1 min; *aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹: 14.6 ± 5.4 min; $P = 3.0 \times 10^{-13}$, Wilcoxon test) in WT ($n = 54$) and *aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹ ($n = 22$) NBs. The above values are the means \pm s.d. Box plot: boxes show the upper and lower quartile. P values are determined with a Wilcoxon test. (c) Box plots showing the time interval between SAC satisfaction and mitotic entry. In WT cells, the time between SAC satisfaction and anaphase onset was 1.76 ± 0.94 min ($n = 54$). By contrast, this interval was much longer, and significantly so, in the *aurA* mutant, at 5.75 ± 1.88 min ($n = 22$). $***P = 1.9 \times 10^{-10}$, Wilcoxon test. Box plot: boxes show the upper and lower quartile. P values are determined with a Wilcoxon test. (d,e) RFP-histone H2A was used to monitor chromosome dynamics (red in the top panels and in the monochrome middle panels), and GFP-Mad2 (green and bottom lower monochrome panels) was used to monitor chromosome attachment and SAC satisfaction. Scale bars, 10 μ m. Time (min:s) is indicated at the top left of each image. NEBD began at 00:00. (d) Analysis of chromosome and GFP-Mad2 dynamics in WT NBs. (e) Analysis of chromosome and GFP-Mad2 dynamics in *aurA*¹⁴⁶⁴¹/*aurA*¹⁷⁹⁶¹ NBs.

sufficient to account for the observed delay in mitosis. Our genetic and live imaging studies indicate that the delay in *aurA* mutant cells has two components, one dependent on the SAC and the other independent of the SAC. In *Drosophila*, mutations affecting APC/C subunits lead to poor CNS development and an accumulation of the mitotic cyclins A and B^{24,25}. Cyclin A levels

are normal and this protein is degraded normally in *aurA* mutant tissues. It is therefore unlikely that overall APC/C activity is affected. Instead, we favour the hypothesis that some, but not all, APC/C substrates (the most important of which being cyclin B) are more stable in *aurA* and are not efficiently ubiquitylated. The underlying mechanism remains unclear, but one recent report



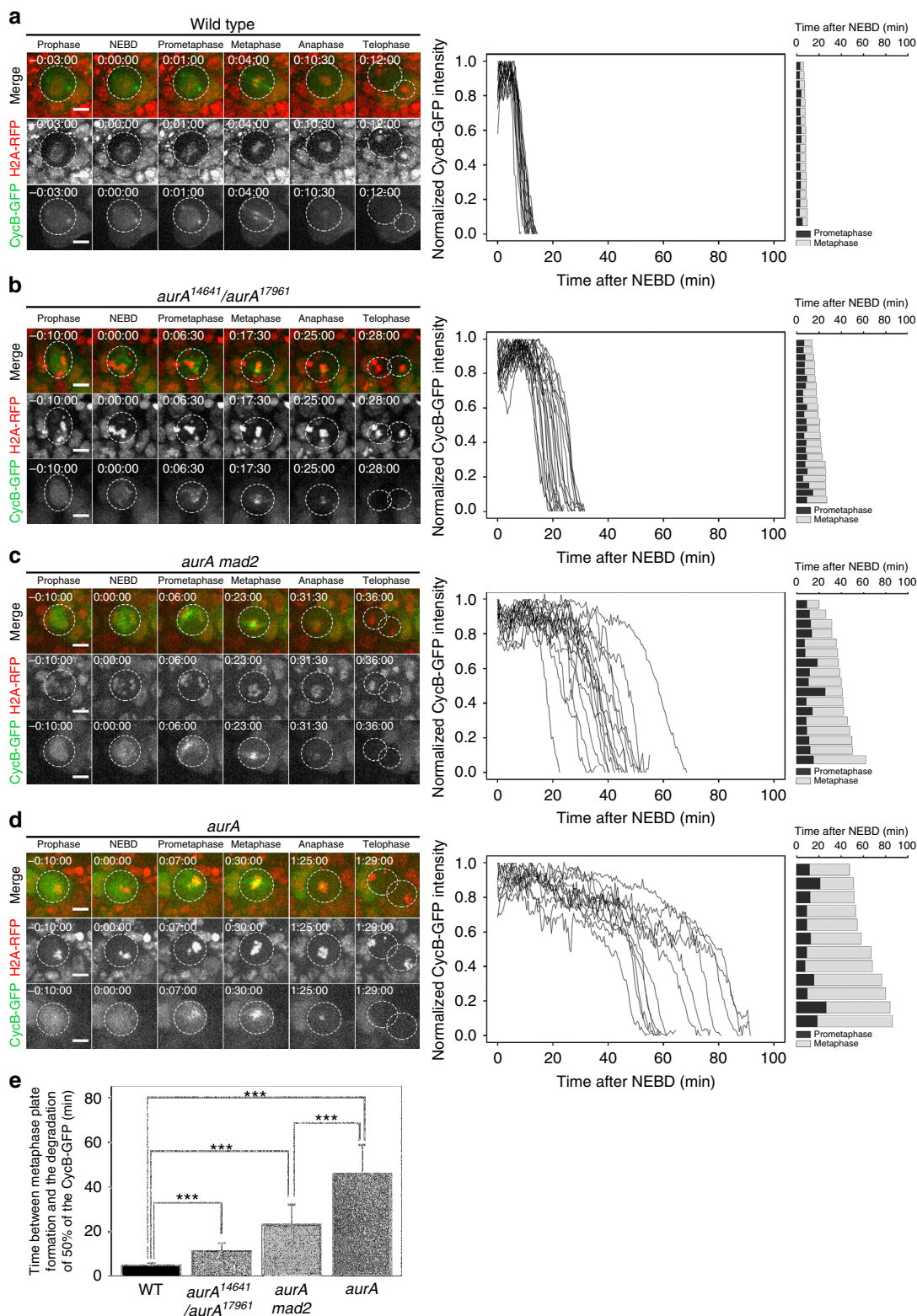


Figure 4 | Cyclin B degradation is delayed in a SAC-independent manner in *aurA* NBs. (a–d) (Far left column panels) RFP-histone H2A was used to monitor chromosome dynamics (red in the top panels and in the middle monochrome panels), and cyclin B-GFP was used to determine the amounts of cyclin B protein in individual cells (green and lower monochrome panels). The panels of the middle column show the cyclin B-GFP degradation profiles of the corresponding genotypes. The timing of mitosis and cyclin B-GFP degradation is indicated for each individual NB. The black and grey bars indicate the durations of prometaphase and metaphase, respectively. Time (h:min:s) is indicated at the top left of each image. NEBD began at 00:00:00. Scale bars, 5 μ m. (a) Timing of mitosis and cyclin B-GFP degradation in WT NBs ($n = 18$). (b) Timing of mitosis and cyclin B-GFP degradation in *aurA¹⁴⁶⁴¹/aurA¹⁷⁹⁶¹* NBs ($n = 23$). (c) Timing of mitosis and cyclin B-GFP degradation in *aurA mad2* double-mutant NBs ($n = 17$). (d) Timing of mitosis and cyclin B-GFP degradation in *aurA* null mutant NBs ($n = 12$). (e) Graph showing the mean time (\pm s.d.) to 50% cyclin B-GFP degradation for WT, *mad2*, *aurA mad2* and *aurA* NBs. WT: 4.8 ± 1.1 min ($n = 18$); *AurA¹⁴⁶⁴¹/aurA¹⁷⁹⁶¹*: 10.3 ± 3.4 min ($n = 23$); *aurA*: 46.2 ± 12.6 min ($n = 12$); and *aurA mad2*: 23.3 ± 8.9 min ($n = 17$). $***P < 7 \times 10^{-5}$ (Wilcoxon test).

revealed that *Drosophila* cyclin B is itself a substrate of Aurora B kinase during abscission, raising the possibility that cyclin B could be a target of Aurora A kinase. However, it seems unlikely that such phosphorylation events could control the correct timing of mitosis, as mitotic timing was found to be normal in dividing germline cells expressing non-phosphorylatable version of cyclin B²⁶. Interestingly, a similar pattern of SAC-independent mitotic arrest has also been described for polo-depleted S2 cells²⁷. In cultured cells, human AurA phosphorylates the activation loop of Plk1, triggering entry into mitosis²⁸. In addition, as the CNS of *polo* mutants also displays NB amplification and tumour formation⁵, it is tempting to speculate that an AurA/Polo kinase cascade could control not only the timely entry into mitosis but also other mitotic events, including cyclin B degradation. APC/C subunits have many sites for *in vivo* phosphorylation by various kinases, including Plk1 and Aurora A^{29,30}. A complex network of phosphorylation/dephosphorylation events is probably required to promote the efficient degradation of APC/C substrates at the onset of anaphase, but Aurora A is undoubtedly a key player in this process.

In flies and human cell lines, Mad2 depletion accelerates the passage through mitosis^{14,31}. Consistent with a role for Aurora A in the regulation of cyclin B degradation, it has been suggested that the overproduction of Aurora A in one human cancer cell line overrides the SAC, leading to premature mitotic exit²³. However, we found that NBs overexpressing Aurora A kinase had normal mitotic timing. Thus, by contrast to findings for human cancer lines, our results favour a model in which a pool of Aurora A functions normally downstream from or in parallel to the SAC, promoting the correctly timed and efficient degradation of cyclin B in fly neural stem cells.

This study reveals, for the first time, that compromised Aurora A activity can prevent chromosome segregation defects and subsequent massive aneuploidy in a SAC-independent manner. This effect seems to be specific to *aurA* mutations, as *sas-4* mutant NBs (which have similar spindle assembly and orientation defects), display severe impairment following SAC inactivation. For brain homeostasis, defective Aurora A activity therefore has disastrous consequences. First, it leads to the generation of many NB-like cells, due to a loss of cell polarity and to incorrect spindle orientation, leading to tumour formation. Second, the prolonged SAC-independent delay in mitosis enables *aurA* cells to avoid the potentially deleterious chromosome segregation defects observed for other mitotic mutants in the absence of the SAC.

Aurora A kinase is a target of several anticancer compounds currently undergoing preclinical trials. However, not all types of cancer seem to respond to Aurora A inhibitors^{32,33}. We describe here an unexpected regulatory mechanism according to which Aurora A inhibition in fly neural stem cells leads to a delay in the progression of mitosis that is sufficiently long to allow the chromosomes to segregate correctly. It will therefore be of great interest to determine whether this mechanism is conserved in humans and whether it affects the relevance of Aurora A-based anticancer treatments in some types of tumours.

Methods

Live microscopy and immunofluorescence analysis. Third-instar larval brains were dissected in Schneider media and NBs were processed for live imaging or immunofluorescence analyses, as previously described¹². Cyclin B-GFP degradation kinetics were analysed in individual NBs, with a published method for human cultured cells and fly NBs^{14,34}. Images were acquired with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon) equipped with a $\times 60$ 1.4 NA (numerical aperture) objective at 25 °C. Z series were acquired every 30 s, with a sCMOS ORCA Flash 4.0 (Hamamatsu) controlled with MetaMorph acquisition software version X. Images were processed for quantification with

ImageJ software and are presented as maximum-intensity projections. GFP fluorescence was quantified for the whole cell. The signal was adjusted for background and for bleaching relative to the signal of a neighbouring non-mitotic cell (for which the signal was assumed to be constant). In the graphs, signal levels for the whole cell are displayed as normalized signals relative to the maximal intensity measured for the cell.

The brain squash analysis protocol for counting mitotic cells has been described elsewhere³⁵. Briefly, brains were dissected in PBS and incubated for 8 min in a 0.5% sodium citrate solution on a glass slide. The brains were then incubated for 30 s in 45% acetic acid and 2 min in 60% acetic acid, squashed with a clean, silicon-coated coverslip and frozen in liquid nitrogen. Once the coverslip had been removed, the preparations were briefly washed in PBS and mounted in ProlongGold + 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 4,6-diamidino-2-phenylindole (Life Technologies). They were visualized with a Leica DMRXA2 microscope (objective $\times 63$, NA 1.32) and images were acquired with a CooSnap ES camera and Metamorph software (Roper Scientific). The images were processed with ImageJ. The mitotic index was calculated by determining the number of mitotic figures per optic field, every four fields. At least three brains were examined for quantification.

Antibodies and western blotting. The monoclonal YL1/2 rat anti-detyrosinated tubulin antibody (1:200) and the mouse monoclonal and rabbit polyclonal anti-phosphorylated histone H3 (Ser10) antibodies (1:500) were obtained from Millipore. The mouse monoclonal anti-cyclin A, anti-prospero and anti-cyclin B antibodies were purchased from the Developmental Studies Hybridoma Bank (1:10). The mouse monoclonal anti-FLAG (1:10,000) antibody was obtained from Stratagene. The rabbit anti-cyclin B antibody (1:10,000) has been described before³⁶ and was kindly provided by David Glover (University of Cambridge, UK). Polyclonal rabbit anti-actin (1:4,000) antibodies were obtained from Santa Cruz, and the rat anti-deadpan antibody (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) was obtained from Abcam. The affinity-purified rabbit anti-Mad2 polyclonal antibody (1:500) was provided by David Sharp (Albert Einstein College of Medicine, New York). Goat secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:5,000) were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories and donkey Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1,000) were obtained from Life Technologies. For western blotting, ECL reagent was purchased from Thermo Fisher Scientific. Some of the western blots were cropped and the original scans of the blots are provided in Supplementary Fig. 6.

Statistical analysis. Differences between data sets were assessed with a non-parametric test (Mann–Whitney–Wilcoxon), with values of $P < 0.01$ considered significant.

Fly strains. Flies were maintained under standard conditions at 25 °C. Transgenic flies with the following genotypes were used for live imaging: H2A-RFP (Bloomington Stock Center), *sas-4²²¹⁴* (ref. 4), cyclin B-GFP²¹, *mad2^P* (ref. 14), GFP-Mad2 (ref. 19) and H2A-GFP³⁷ have been described elsewhere.

The *aurA⁸⁸³⁹* allele (hereafter referred to as *aurA*) introduces a stop codon at position 377 in the open reading frame of the kinase⁷. The resulting mutant kinase has no detectable activity *in vitro*, like the K377R (dead) mutant^(7,38). The *aurA¹⁴⁶⁴¹/aurA¹⁷⁹⁶¹* allelic combination has been described before and the corresponding fly stocks were provided by Chris Doe (University of Oregon) and Chen Yu Lee (University of Michigan)⁷. UAS-FLAG-AurA and UAS-FLAG-AurA^{K/R} plasmids were constructed by the recombination of AurA and AurA^{K/R} donor vectors (described in ref. 38) in pPFW (*Drosophila* Genomic Resources Center) with Gateway technology (Life Technologies). Transgenic flies were obtained by P element-mediated transformation. The production of tagged proteins in the fly CNS was induced with the 69B-GAL4 strain¹².

References

1. Homem, C. C. & Knoblich, J. A. *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development* **139**, 4297–4310 (2012).
2. Siller, K. H. & Doe, C. Q. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat. Cell. Biol.* **11**, 365–374 (2009).
3. Wodarz, A. & Nathke, I. Cell polarity in development and cancer. *Nat. Cell. Biol.* **9**, 1016–1024 (2007).
4. Basto, R. *et al.* Flies without centrioles. *Cell* **125**, 1375–1386 (2006).
5. Castellanos, E., Dominguez, P. & Gonzalez, C. Centrosome dysfunction in *Drosophila* neural stem cells causes tumors that are not due to genome instability. *Curr. Biol.* **18**, 1209–1214 (2008).
6. Giet, R., Petretti, C. & Prigent, C. Aurora kinases, aneuploidy and cancer, a coincidence or a real link? *Trends Cell Biol.* **15**, 241–250 (2005).
7. Lee, C. Y. *et al.* *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev.* **20**, 3464–3474 (2006).
8. Wang, H. *et al.* Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev.* **20**, 3453–3463 (2006).

9. Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T. & Knoblich, J. A. Linking cell cycle to asymmetric division: Aurora-A phosphorylates the Par complex to regulate Numb localization. *Cell* **135**, 161–173 (2008).
10. Giet, R. *et al.* Drosophila Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J. Cell Biol.* **156**, 437–451 (2002).
11. Glover, D. M., Leibowitz, M. H., McLean, D. A. & Parry, H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* **81**, 95–105 (1995).
12. Gallaud, E. *et al.* Ensconsin/Map7 promotes microtubule growth and centrosome separation in Drosophila neural stem cells. *J. Cell Biol.* **204**, 1111–1121 (2014).
13. Janssen, A., Kops, G. J. & Medema, R. H. Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 19108–19113 (2009).
14. Buffin, E., Emre, D. & Karess, R. E. Flies without a spindle checkpoint. *Nat. Cell Biol.* **9**, 565–572 (2007).
15. Caussinus, E. & Gonzalez, C. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in Drosophila melanogaster. *Nat. Genet.* **37**, 1125–1129 (2005).
16. Rahmani, Z., Gagou, M. E., Lefebvre, C., Emre, D. & Karess, R. E. Separating the spindle, checkpoint, and timer functions of BubR1. *J. Cell Biol.* **187**, 597–605 (2009).
17. Johnston, C. A., Hirono, K., Prehoda, K. E. & Doe, C. Q. Identification of an Aurora-A/Pins/LINKER/Dlg spindle orientation pathway using induced cell polarity in S2 cells. *Cell* **138**, 1150–1163 (2009).
18. Donaldson, M. M., Tavares, A. A., Ohkura, H., Deak, P. & Glover, D. M. Metaphase arrest with centromere separation in polo mutants of Drosophila. *J. Cell Biol.* **153**, 663–676 (2001).
19. Buffin, E., Lefebvre, C., Huang, J., Gagou, M. E. & Karess, R. E. Recruitment of Mad2 to the kinetochore requires the Rod/Zw10 complex. *Curr. Biol.* **15**, 856–861 (2005).
20. Katsani, K. R., Karess, R. E., Dostatni, N. & Doye, V. *In vivo* dynamics of Drosophila nuclear envelope components. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3652–3666 (2008).
21. Huang, J. & Raff, J. W. The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in Drosophila cells. *EMBO J.* **18**, 2184–2195 (1999).
22. Lampson, M. A. & Kapoor, T. M. The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat. Cell Biol.* **7**, 93–98 (2005).
23. Anand, S., Penrhyn-Lowe, S. & Venkitaraman, A. R. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* **3**, 51–62 (2003).
24. Nagy, O. *et al.* lemmingA encodes the Apc11 subunit of the APC/C in Drosophila melanogaster that forms a ternary complex with the E2-C type ubiquitin conjugating enzyme, Vihar and Morula/Apc2. *Cell Div.* **7**, 9 (2012).
25. Deak, P., Donaldson, M. & Glover, D. M. Mutations in makos, a Drosophila gene encoding the Cdc27 subunit of the anaphase promoting complex, enhance centrosomal defects in polo and are suppressed by mutations in twins/aar, which encodes a regulatory subunit of PP2A. *J. Cell Sci.* **116**, 4147–4158 (2003).
26. Mathieu, J. *et al.* Aurora B and cyclin B have opposite effects on the timing of cytokinesis abscission in Drosophila germ cells and in vertebrate somatic cells. *Dev. Cell* **26**, 250–265 (2013).
27. Conde, C. *et al.* Drosophila Polo regulates the spindle assembly checkpoint through Mps1-dependent BubR1 phosphorylation. *EMBO J.* **32**, 1761–1777 (2013).
28. Macurek, L. *et al.* Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* **455**, 119–123 (2008).
29. 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.* **4**, ra42 (2011).
30. Kettenbach, A. N. *et al.* Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Sci. Signal.* **4**, rs5 (2011).
31. Meraldi, P., Draviam, V. M. & Sorger, P. K. Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev. Cell* **7**, 45–60 (2004).
32. Malumbres, M. & Perez de Castro, I. Aurora kinase A inhibitors: promising agents in antitumoral therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **18**, 1377–1393 (2014).
33. Perez de Castro, I. *et al.* Requirements for Aurora-A in tissue regeneration and tumor development in adult mammals. *Cancer Res.* **73**, 6804–6815 (2013).
34. Clute, P. & Pines, J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nat. Cell Biol.* **1**, 82–87 (1999).
35. Pimpinelli, S., Bonaccorsi, S., Fanti, L. & Gatti, M. Preparation and orcein staining of mitotic chromosomes from Drosophila larval brain. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2010**, pdb prot5389 (2010).
36. Whitfield, W. G., Gonzalez, C., Maldonado-Codina, G. & Glover, D. M. The A- and B-type cyclins of Drosophila are accumulated and destroyed in temporally distinct events that define separable phases of the G2-M transition. *EMBO J.* **9**, 2563–2572 (1990).
37. Saint, R. & Clarkson, M. Pictures in cell biology. A functional marker for Drosophila chromosomes in vivo. *Trends Cell Biol.* **10**, 553 (2000).
38. Rome, P. *et al.* Aurora A contributes to p150(glued) phosphorylation and function during mitosis. *J. Cell Biol.* **189**, 651–659 (2010).

Acknowledgements

This work was funded by the *Ligue Nationale Contre le Cancer*, *l'Association de la Recherche contre le Cancer*, Biosit and the University of Rennes 1. We thank D. Sharp, D. Buster, J. Raff, R. Basto, C. Doe, C.Y. Lee and D. Glover for fly stocks and antibodies. We thank the Microscopy Rennes Imaging Center and E. Gallaud for advices and help in designing experiments. R.C. is a doctoral fellow of the French Ministry of Research and the *Association de la Recherche contre le Cancer*.

Author contributions

R.C. and R.G. conceived the project and designed the experiments with the help of R.K.; R.C. performed the experiments with help from P.R., R.G., A.P. and L.R.-P.; L.R.-P., R.C., R.K. and R.G. interpreted the data; R.G. wrote the paper with the help of R.C., L.R.-P. and R.K.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

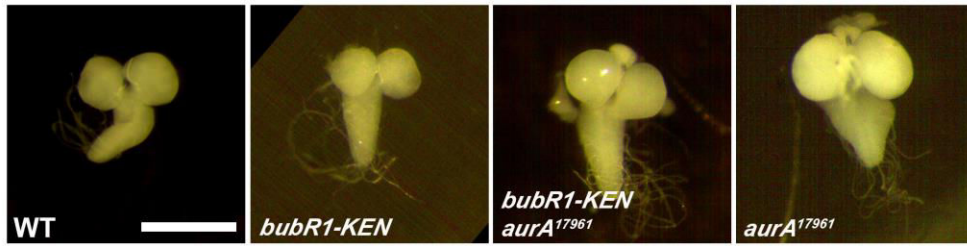
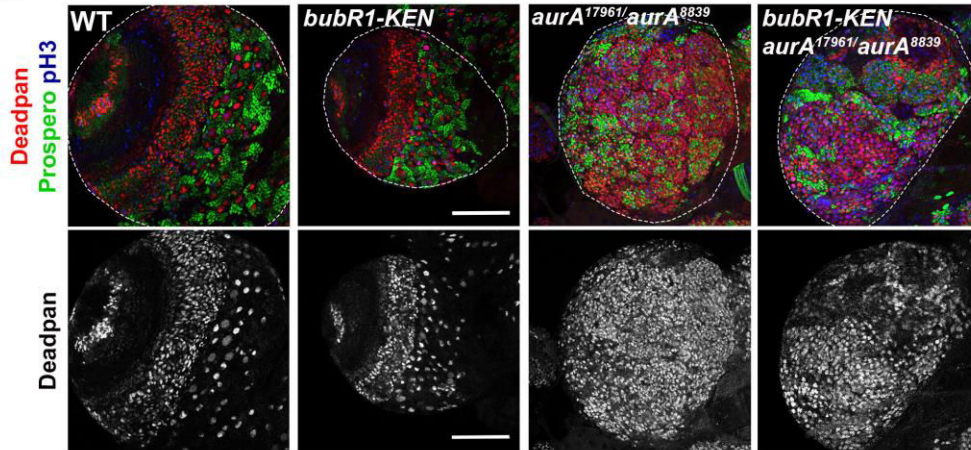
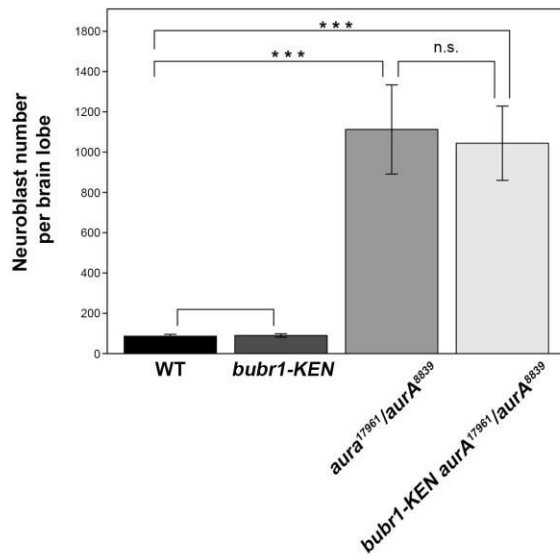
Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Caous, R. *et al.* Spindle assembly checkpoint inactivation fails to suppress neuroblast tumour formation in *aurA* mutant *Drosophila*. *Nat. Commun.* **6**:8879 doi: 10.1038/ncomms9879 (2015).



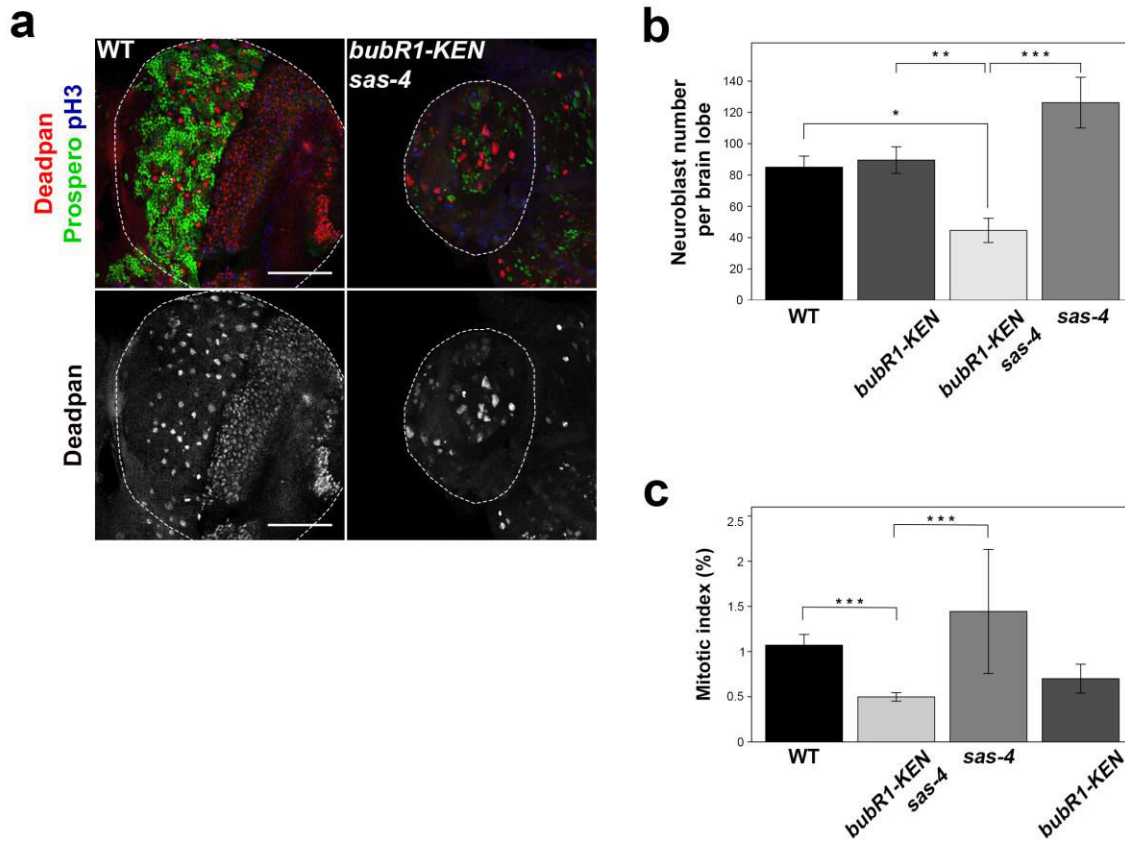
This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

a**b****c**

Supplementary Figure 1. *bubR1-KEN*; *aurA* double mutants display brain overgrowth and NB amplification

a) Brains from WT, *bubR1-KEN*, *aurA¹⁷⁹⁶¹* and *bubR1-KEN aurA¹⁷⁹⁶¹* double-mutant individuals were dissected in PBS, fixed and immediately imaged. Note the huge brain expansion in *aurA¹⁷⁹⁶¹* and in *bubR1-KEN aurA¹⁷⁹⁶¹* double mutants 144 h after larval hatching (ALH). Scale bar: 200 μ m. **b)** Brains from the indicated genotypes were fixed and the numbers of pan-NBs per lobe were determined by staining of the central brain region with the anti-deadpan antibody (red and lower monochrome panels). The neuronal marker prospero is shown in green. Phospho-histone H3 (Ser10) is displayed in blue. Scale bar: 100 μ m.

c) Quantification of pan-NBs numbers (\pm SD) in WT, *bubR1-KEN*, *aurA¹⁷⁹⁶¹/aurA⁸⁸³⁹* and *bubR1-KEN aurA¹⁷⁹⁶¹/aurA⁸⁸³⁹* brain lobes. WT and *bubR1-KEN* brain lobes had 86.0 ± 9.3 NBs/lobe, ($n=5$) and 89.5 ± 9.5 NBs/lobe ($n=11$), respectively, whereas *aurA¹⁷⁹⁶¹/aurA⁸⁸³⁹* lobes contained 1112 ± 221.3 NBs per lobe ($n=7$). Introduction of the *bubR1-KEN* mutation into the *aurA* defective background had no significant effect on NB number (1044.0 ± 184.3 , $n=8$, ns: $P=0.78$). ***: $P < 3 \times 10^{-3}$ (Wilcoxon test).

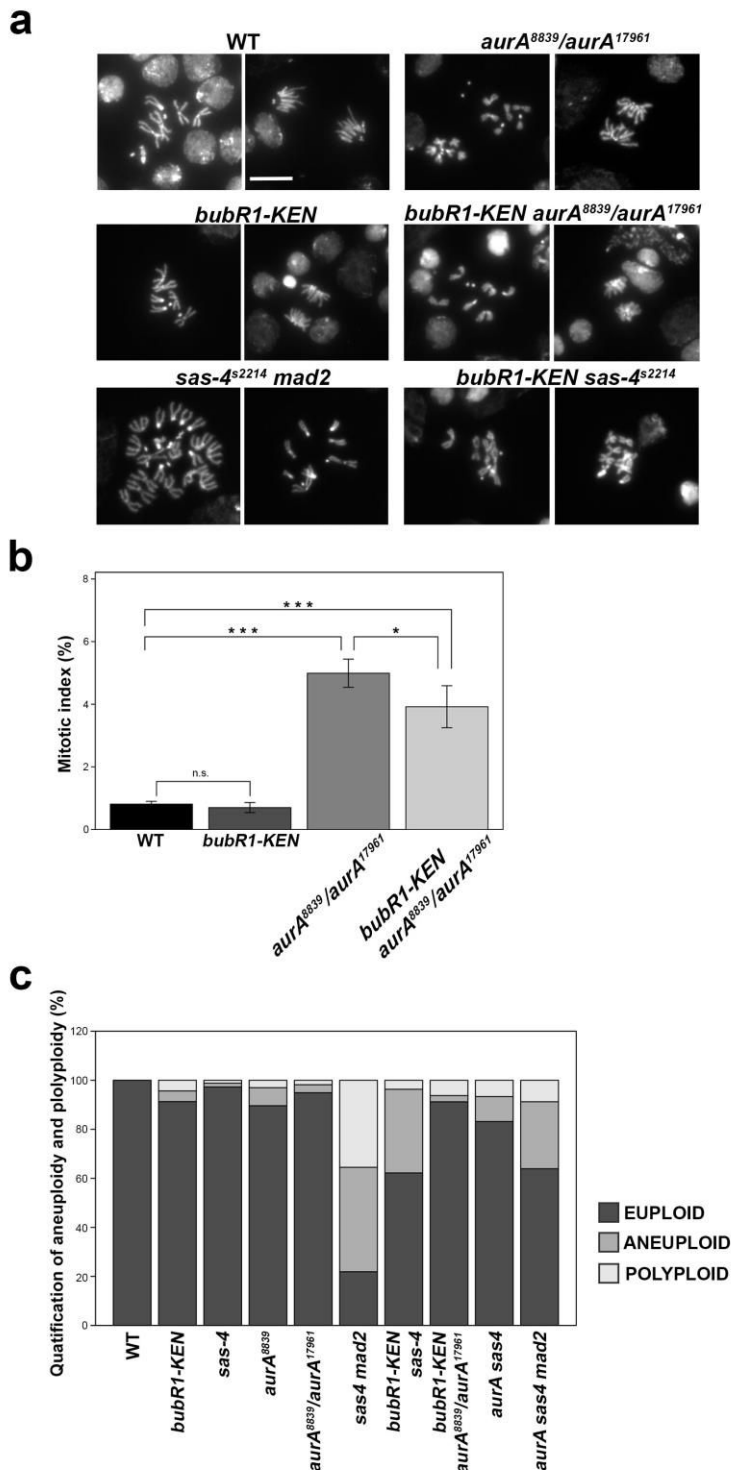


Supplementary Figure 2. *bubR1-KEN sas-4* double mutants have smaller numbers of NBs and impaired brain growth

a) Brains from WT or *bubR1-KEN sas-4* larvae were fixed and the numbers of pan-NBs per lobe were counted by staining of the central brain region with an anti-deadpan antibody (red and lower monochrome panels). The neuronal marker prospero is shown in green. Phospho-histone H3 (Ser10) is displayed in blue. Scale bar: 100 μ m.

b) Quantification of pan-NBs number (\pm SD) in WT, *bubR1-KEN*, *sas-4* and *bubR1-KEN sas-4* brain lobes. WT and *bubR1-KEN* brain lobes had 85.0 ± 7.1 NBs/lobe ($n=7$) and 89.96 ± 8.5 NBs/lobe ($n=8$) respectively. *Sas-4*: 126.2 ± 16.2 NBs/lobe ($n=8$). The introduction of the *bubR1-KEN* mutation in the *sas-4* defective background resulted in a much smaller number of NBs 44.6 ± 7.7 NBs/lobe ($n=8$). *: $P=1.4 \times 10^{-3}$, **: $P=3.3 \times 10^{-4}$, ***: $P < 1.6 \times 10^{-5}$ (Wilcoxon test).

c) Analysis of mitotic indices (\pm SD) in WT, *sas-4*, *bubR1-KEN*, and *bubR1-KEN sas-4* Brains. WT: $1.07 \pm 0.12\%$ ($n=9899$, 3 brains), *bubR1-KEN*: $0.70 \pm 0.16\%$, ($n=5918$, 3 brains), *sas-4*: $1.44 \pm 0.69\%$, ($n=12417$, 3 brains), and *bubR1-KEN sas-4*: $0.50 \pm 0.05\%$ ($n=5520$, 3 brains). ***: $P < 6 \times 10^{-6}$, (Wilcoxon test).



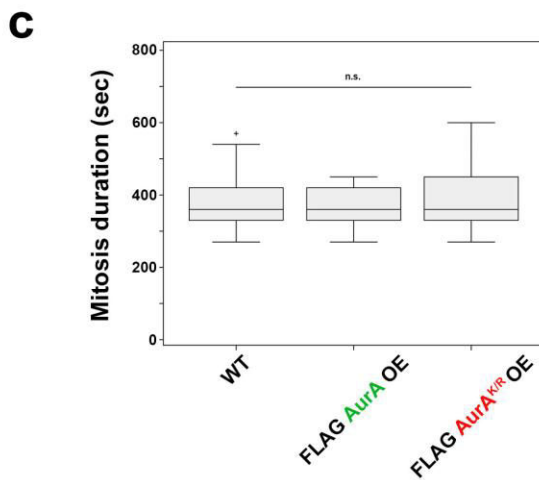
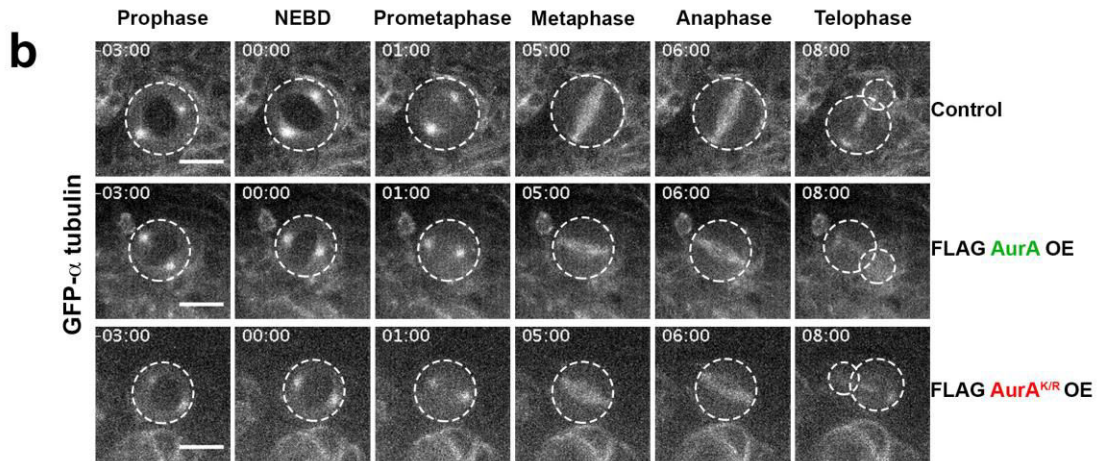
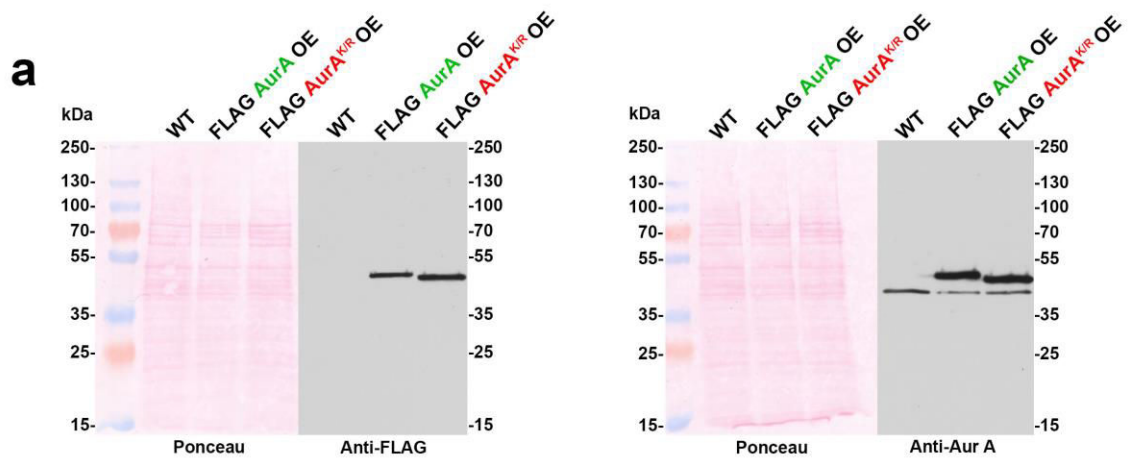
Supplementary Figure 3. Analysis of mitotic chromosome number and mitotic indices in *sas-4* and *aurA* mutant flies following disruption of the SAC

a) Selection of the most prominent mitotic figures observed in brain squashes for the genotypes indicated. The vast majority of cells are euploid in WT, *sas-4*, *mad2*, *bubR1-KEN*, and *aurA* flies. However, disrupting the SAC (*mad2* or *bubR1-KEN* mutants) in *sas-4*, but not in *aurA¹⁷⁸⁹⁶¹/aurA⁸⁸³⁹* flies, induced severe aneuploidy and polyploidy. **b)** Quantification of mitotic indices (\pm SD) for the indicated genotypes.

WT: 0.81 ± 0.09 ($n=5326$, 3 brains), *bubR1-KEN*: 0.7 ± 0.16 ($n=5918$, 4 brains), *aurA⁸⁸³⁹/aurA¹⁷⁹⁶¹*: 4.99 ± 0.45 ($n=7435$, 4 brains), *bubR1-KEN aurA⁸⁸³⁹/aurA¹⁷⁹⁶¹*: 3.92 ± 0.67 ($n=11180$, 5 brains). ***: $P < 2 \times 10^{-16}$, *: $P = 5 \times 10^{-4}$ (Wilcoxon test). **c)** Quantification of aneuploidy and polyploidy for the indicated genotypes.

The numbers in parentheses are the percentages of euploid, aneuploid and polyploid cells, respectively; n is the total number of mitotic cells observed, from at least 3 different brains.

WT (100, 0, 0, $n=150$), *bubR1-KEN* (91.3, 4.4, 4.3, $n=230$), *sas-4* (97.3, 1.5, 1.2, $n=256$), *aurA⁸⁸³⁹* (89.6, 7.4, 3.0, $n=299$), *aurA⁸⁸³⁹/aurA¹⁷⁹⁶¹* (94.9, 3.3, 1.8, $n=276$), *sas4 mad2* (21.9, 42.6, 35.5, $n=169$), *bubR1-KEN sas-4* (62.2, 34.2, 3.7, $n=82$), *bubR1-KEN aurA⁸⁸³⁹/aurA¹⁷⁹⁶¹* (91.2, 2.6, 6.2, $n=432$), *aurA⁸⁸³⁹ sas-4* (83.2, 10.2, 6.6, $n=315$), *aurA sas4 mad2* (63.9, 27.3, 8.8, $n=194$).

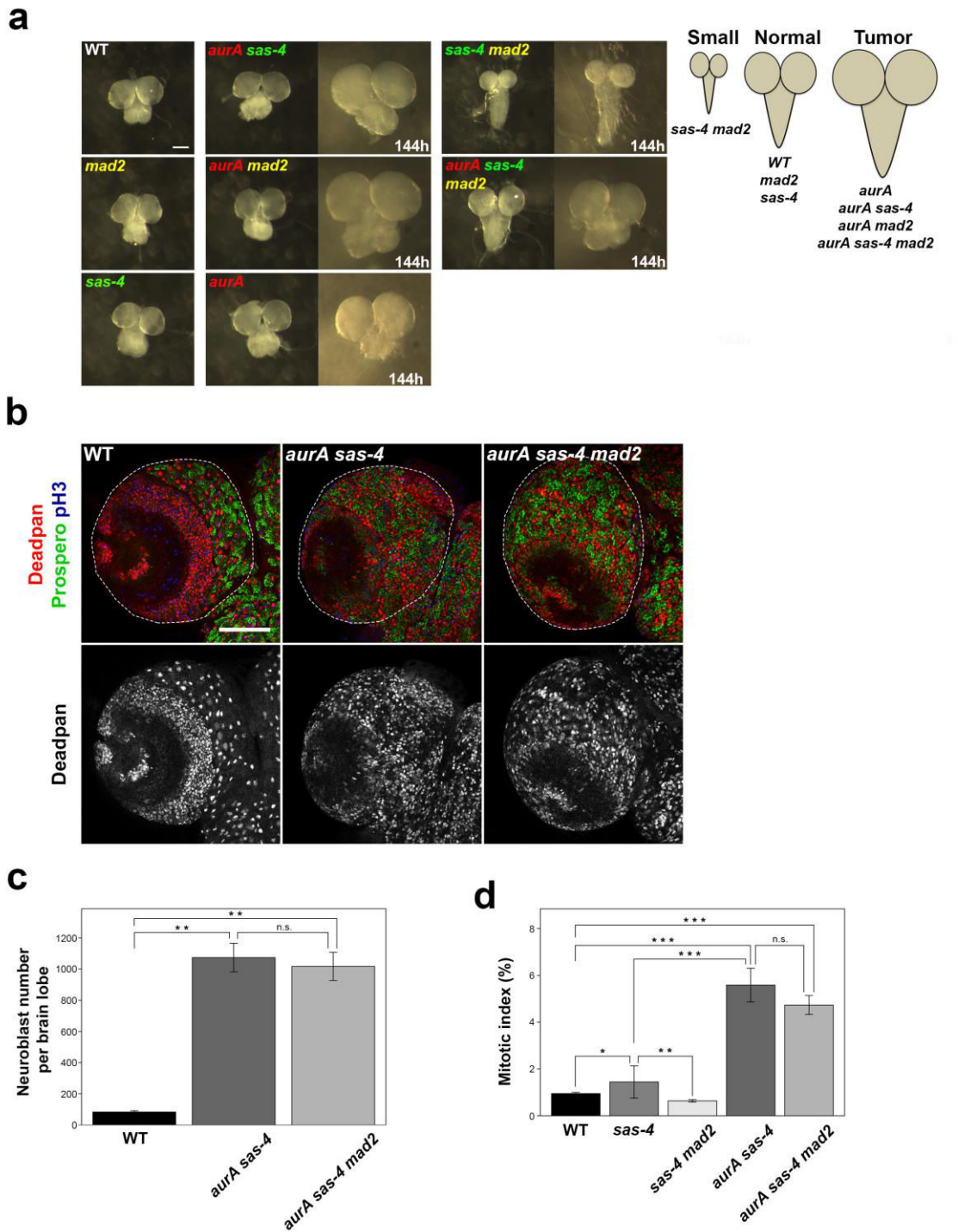


Supplementary Figure 4. AurA overexpression (OE) does not accelerate mitotic exit

a) Western blots showing the levels of endogenous and FLAG-tagged AurA variants in brain tissues. The FLAG western blot showing the overexpressed (AurA and AurA^{K/R}) exogenous proteins is on the left and the western blot showing both endogenous and exogenous AurA proteins is shown on the right. Ponceau S staining was used to control for loading control.

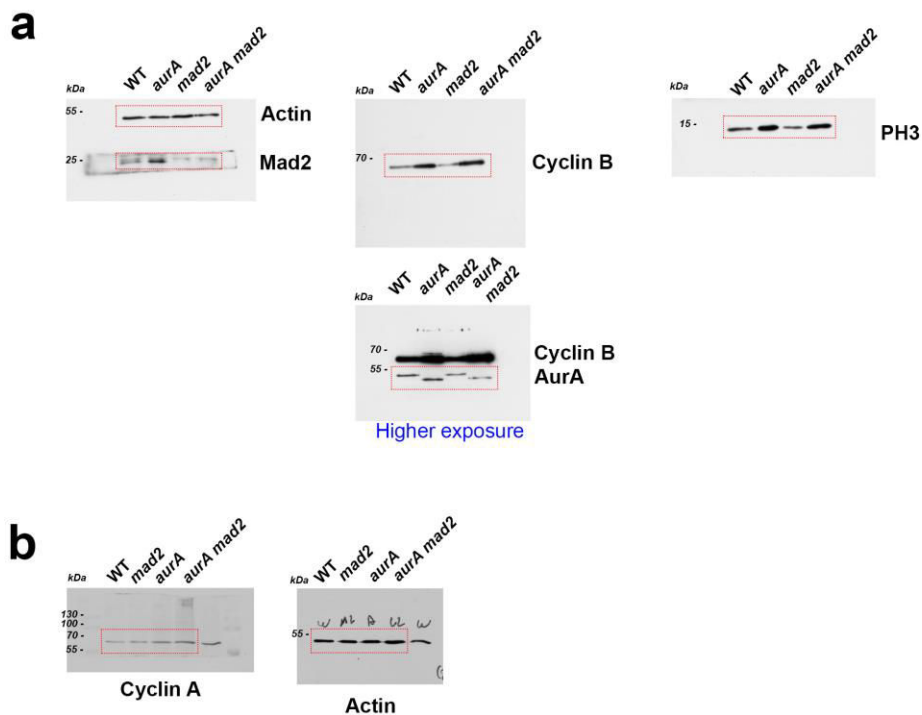
b) AurA and AurA^{K/R} OE NBs display normal mitotic timing and normal spindle morphology. WT (top panels), FLAG-AurA OE (middle panels), and FLAG-AurA^{K/R} OE (lower panels) NBs were imaged with GFP- α tubulin.

c) Box plot showing the duration of mitosis after overexpression of active and inactive Aurora A kinases. The duration of mitosis was not modified by the overexpression of active (FLAG-AurA OE, 371 ± 51 s, $n=56$) or inactive (FLAG-AurA^{K/R} OE, 384 ± 84 s, $n=63$) AurA kinases, as shown by comparison with WT NBs (382 ± 66 s, $n=64$). Box plot: boxes show the upper and lower quartile. ns: non significant ($P > 0.01$, Wilcoxon test).



Supplementary Figure 5. *aurA* mutation restores overproliferation of the NB phenotype in the *sas-4 mad2* double mutant

a) Brains from WT, *mad2*, *sas-4 mad2*, *aurA*, *aurA sas-4*, *aurA mad2*, and *aurA sas-4 mad2* mutant individuals were dissected in PBS, fixed and immediately imaged. Note the impairment of brain growth following disruption of the SAC and *sas-4* (*mad2 sas-4*). The scale bar indicates 0.1 mm. The diagram on the left summarizes the various brain phenotypes associated with the genotypes examined. **b)** Brains from WT, *aurA sas-4* and *aurA sas-4 mad2* triple mutants were fixed and the numbers of pan-NBs per lobe were determined in the central brain region with an anti-deadpan antibody (red and lower monochrome panels). The neuronal marker prospero is shown in green. Phospho-histone H3 (Ser10) is displayed in blue. Scale bar: 100 μ m. **c)** Quantification of pan-NBs, in terms of number, in the various genetic backgrounds analyzed. WT: 83.4 ± 8.5 NBs/lobe ($n=12$), *aurA sas-4*: 1073.5 ± 91.7 NBs/lobe ($n=8$), *aurA sas-4 mad2*: 1016.7 ± 90.2 NBs/lobe ($n=8$). **: $P < 4 \times 10^{-4}$ (Wilcoxon test). **d)** Mitotic indices in WT, *sas-4*, *aurA sas-4*, *sas-4 mad2* and *aurA sas-4 mad2* neural tissues. WT: 0.95 ± 0.05%, ($n=5626$ cells, 3 brains), *sas-4*: 1.45 ± 0.7% ($n=12417$ cells, 3 brains), *sas-4 mad2*: 0.63 ± 0.05%, ($n=4962$ cells, 3 brains), *aurA sas-4*: 5.6 ± 0.7% ($n=5348$ cells, 3 brains) *aurA sas-4 mad2*: 4.7 ± 0.4% ($n=13209$ cells, 3 brains). ***: $P < 2 \times 10^{-16}$, ** $P < 10^{-5}$, * $P < 0.03$ (Wilcoxon test).



Supplementary Figure 6. Whole western blots related to Figure 2c.

Note that all the antibodies used for the western blots of this study correspond to well-characterised proteins. Therefore, one nitrocellulose membrane was often cutted (thanks to molecular weight markers) to detect 2 antigens.

a) Full western blots corresponding to the left panel of Figure 2c. Top left panel: the same nitrocellulose membrane was cutted to reveal actin (~40 kDa) and Mad2 (~24 kDa). Middle panel: the same nitrocellulose membrane was cutted to reveal cyclin B (~60 kDa) and Aurora A (47 kDa). The middle bottom panel corresponds to longer revelation time. Right: full blot corresponding to phosphor histone H3 Ser10 (~15 kDa).

b) Full cyclin A (left) and actin (right) western blots corresponding to the right panel of Figure 2c. The cropped region is indicated in red.

Discussion et perspectives

A. Une forte aneuploïdie compromet-elle la prolifération cellulaire et la tumorigénèse ?

Le point de départ de mon projet de thèse consistait à tester l'hypothèse selon laquelle, générer une forte aneuploïdie dans des tumeurs permettrait d'interférer avec la prolifération cellulaire et la croissance tumorale. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser comme modèle des tumeurs du système nerveux central de la larve de drosophile. Parmi les nombreux mutants induisant la formation de tumeur dans le SNC à notre disposition, nous avons fait le choix d'en utiliser deux, les mutants *sas-4* et *aurA*. Nous avons choisi ces deux mutants car les protéines Sas-4 et AurA sont requises pour la formation du fuseau mitotique et la division asymétrique. AurA est également impliquée dans la mise en place de la polarité dans le Nb. Il est important de noter que les tumeurs induites dans ces deux mutants présentent un délai en mitose dû à l'activation du SAC (à cause des problèmes de formation du fuseau) qui corrige les défauts d'attachements Mt-Kt et par conséquent, ces tumeurs ne présentent pas (ou peu) d'aneuploïdie. Nous avons ensuite choisi de générer de l'aneuploïdie dans ces tumeurs en supprimant le SAC par l'association d'une mutation pour un gène essentiel du SAC, Mad2 (Buffin et al., 2007). L'intérêt de ce mutant réside dans le fait que, au contraire des autres protéines impliquées dans le SAC, Mad2 n'a pas d'autre fonction, notamment dans les interactions Mt-Kt.

Afin de répondre à notre question, nous avons débuté notre analyse en utilisant le mutant *sas-4*. Ce mutant est dépourvu de centrosome et présente des défauts d'assemblage du fuseau mitotique (et une activation du SAC) et de division asymétrique des Nb (conduisant à la formation de tumeurs) (Basto et al., 2006; Castellanos et al., 2008). Nous avons mis en évidence que la déplétion du SAC (*via* l'utilisation de mutant du SAC *mad2^p* ou *bubR1^{ken}*) dans ce mutant compromet la prolifération cellulaire, la croissance des cerveaux et génère une forte aneuploïdie. De plus, le double mutant *sas-4 mad2* n'est pas en mesure d'induire la formation de tumeurs. Cela suggère que la perte du SAC et la génération d'une forte aneuploïdie dans un contexte mutant pour *sas-4* permet de prévenir la formation de tumeur.

Pour confirmer ce résultat, nous avons poursuivi l'étude en utilisant un second mutant induisant des tumeurs dans le SNC, *aurA*. AurA est impliquée dans la maturation des centrosomes et la formation du fuseau ainsi que dans l'établissement de la polarité cellulaire du Nb (voir introduction). Ce mutant présente une très forte prolifération des Nb dans le

cerveau larvaire et un fort pouvoir tumorigène après implantation dans l'abdomen d'un hôte adulte (Castellanos et al., 2008; Lee et al., 2006a; Wang et al., 2006). Ici, au contraire des résultats que nous avons obtenus précédemment, la déplétion du SAC ne compromet pas la prolifération cellulaire ni le pouvoir des cerveaux doubles mutants *aurA mad2* à former des tumeurs. Nous avons, par la suite, mis en évidence qu'AurA est impliquée dans la régulation de la dégradation de la CycB et c'est cela qui permet, en absence de SAC, de laisser le temps aux Nb pour assembler un fuseau et ségréger correctement leurs chromosomes.

Nous avons observé deux réponses différentes à la perte du SAC et nous ne pouvons donc pas conclure formellement quant à l'effet de l'aneuploïdie sur la prolifération cellulaire et la tumorigénèse chez la drosophile. Si, pour les tumeurs causées par la perte de Sas-4, la déplétion du SAC semble délétère, dans le mutant *aurA*, un mécanisme secondaire vient empêcher l'apparition d'une forte aneuploïdie et permet aux Nb de résister à la perte du SAC. Malgré que le mutant *aurA* semblait être un bon outil (rôle dans la polarité et l'assemblage du fuseau), il s'est avéré non pertinent pour répondre à notre question. Afin de résoudre ce problème, il sera nécessaire de poursuivre l'étude en utilisant d'autres mutants de polarité comme les mutants de Brat, qui présentent un fort pouvoir tumorigène ou les mutants de Pins et Mira (Caussinus and Gonzalez, 2005). On ne peut également, à ce stade, exclure le fait que ce que nous observons dans le mutant *sas-4* soit spécifique à ce mutant. L'étude de l'effet de la perte du SAC dans les mutants des centrosomes *sas-6* ou *asterless* permettra de répondre à cette question et d'envisager, si les mêmes effets dans les mutants de polarité et du fuseau sont observés, un mécanisme général en réponse à une forte aneuploïdie dans le Nb de drosophile. Cela permettra également de mettre en opposition les effets de l'aneuploïdie sur des tumeurs issues de défaut de polarité contre celles issues de défaut de centrosomes et orientation du fuseau. Ces deux types de tumeurs, chez la drosophile, ne présentent pas les mêmes caractéristiques de prolifération ni de capacité tumorale. Les cerveaux dont les Nb présentent un défaut de polarité forment des tumeurs avec forte fréquence (91% pour les mutants *brat*, 19% pour les mutants *mira*) alors que les mouches sans centrosomes présentent une plus faible fréquence tumorale (6% pour *sas-4* ou 4% pour *asterless*, 1% avec *sas-6*) (Castellanos et al., 2008; Caussinus and Gonzalez, 2005). On peut imaginer, par exemple, qu'il soit plus facile d'éliminer des tumeurs qui prolifèrent peu en générant de l'aneuploïdie (ce que l'on observe pour *sas-4*) que d'éliminer, par cette stratégie, des tumeurs qui prolifèrent beaucoup et ainsi orienter les futurs travaux et thérapeutiques. Cela permettra aussi de déterminer si, dans le cas de tumeurs dues ou présentant une perte d'asymétrie de division

chez l'homme (Lee and Vasioukhin, 2008; Wodarz and Näthke, 2007), cette stratégie est envisageable.

Il est aussi important de noter que nous utilisons un modèle cellulaire particulier, une cellule souche. Un récent article a montré que les Nb ne réagissent pas à l'aneuploïdie en déclenchant l'apoptose comme d'autres types cellulaires (Gogendeau et al., 2015). Les auteurs de cette étude proposent que, dans le Nb, l'aneuploïdie conduit à une différenciation prématurée qui empêche leur prolifération et leur expansion incontrôlée (Dekanty and Milán, 2013; Gogendeau et al., 2015; Thompson and Compton, 2010). Les Nb aneuploïdes présentent une phase G1 étendue avant de sortir du cycle cellulaire (entrée en G0) puis d'entreprendre une différenciation prématurée (présence de Pros nucléaire). Ce mécanisme semble être conservé dans les cellules souches intestinales murines quand l'apoptose n'est pas suffisamment efficace pour supprimer ces cellules (Gogendeau et al., 2015). Bien que les résultats obtenus par le groupe de R. Basto (Gogendeau et collaborateurs) proposent des éléments permettant d'expliquer la baisse de prolifération observée dans le double mutant *sas-4 mad2*, ils posent également la question de la différence entre cellules souches et les autres types cellulaires. Ainsi, générer de l'aneuploïdie dans des tumeurs issues (ou présentant des phénotypes) de cellules souches chez l'homme pourrait être plus efficace pour ralentir la croissance tumorale (sortie du cycle cellulaire) que pour « tuer » les cellules cancéreuses. Il faudrait donc y associer d'autres molécules lors des traitements pour les éliminer efficacement.

Au cours de ma thèse, une étude est venue apporter des arguments en faveur de l'utilisation de l'aneuploïdie contre la tumorigénèse (Silk et al., 2013). Les auteurs ont utilisé des souris présentant une réduction du niveau de la protéine CENP-E impliquée dans les attachements Mt-Kt (CENP-E^{+/-}). Cette réduction de CENP-E entraîne l'apparition de cancers de la rate et des poumons faiblement aneuploïdes. Ils ont associé cette lignée avec une autre présentant un niveau de Mad2 réduit (Mad2^{+/-}) avec un SAC moins efficace et observé alors l'apparition d'une forte aneuploïdie entraînant la mort cellulaire et la suppression des tumeurs. Cela semble donc indiquer, ici dans un modèle murin, qu'une forte aneuploïdie est incompatible avec la croissance tumorale, ce qui va dans le sens de nos résultats et de ceux du groupe de R. Basto.

Bien que nécessitant de plus amples investigations dans différents types cellulaires et tumeurs d'origines différentes, la génération d'une forte aneuploïdie semble tendre à chaque fois vers une réduction de la prolifération et la croissance tumorale. Cette approche pourrait donc être une excellente stratégie anticancéreuse. L'utilisation de drogues bloquant Mad2 (Kastl et al., 2015; Tambe et al., 2016) ou d'autres protéines causant une perte du SAC comme Mps1 (Janssen et al., 2009, 2011) est donc tout à fait prometteuse en complément des traitements actuels pour lutter contre le cancer (Dominguez-Brauer et al., 2015).

B. Un nouveau rôle d'AurA dans la régulation de la dégradation de la CycB

Dans le but de comprendre pourquoi la perte du SAC dans le mutant *aurA* n'a pas d'effet sur la tumorigénèse, nous avons réalisé une analyse à l'aide d'une technique de vidéo-microscopie en temps réel. Nous avons mis en évidence que les cellules doubles mutantes présentent toujours un délai en mitose malgré l'absence de SAC fonctionnel et qu'il existe un découplage (délai) entre satisfaction du SAC et entrée en anaphase dans le mutant *aurA*. Nous avons également observé que la perte d'AurA entraîne un délai dans la dégradation de la CycB, même en absence de SAC actif. Ces résultats suggèrent que le délai en mitose observé dans le mutant *aurA* est d'une part dû à l'activation du SAC et, d'autre part, dû à un défaut de régulation de la dégradation de la CycB. Nous avons également vérifié que ce phénotype est bien dépendant de la perte d'AurA car un triple mutant *aurA sas-4 mad2* présente également une hyper-prolifération des Nb et une restauration partielle de la ploïdie. Cela nous a donc amené à proposer un nouveau rôle d'AurA dans le contrôle de la dégradation de la CycB et la sortie de mitose. En revanche, le mécanisme impliqué reste à élucider mais plusieurs hypothèses sont à l'étude.

1. Hypothèse sur le mécanisme de régulation de la dégradation de la CycB par AurA

a. Hypothèse n°1 : Une phospho-régulation de la CycB par les kinases Aurora

Un article récent a montré que la CycB est un substrat d'AurB chez la drosophile lors de l'abscission dans les cystes de la lignée germinale femelle (Mathieu et al., 2013). AurA et AurB sont très proches comme en témoigne le fait que le changement d'un seul acide aminé d'AurA lui fait acquérir les fonctions d'AurB (Fu et al., 2009; Hans et al., 2009) et que lorsque leurs localisations cellulaires sont inversées, chacune est capable de faire le travail de l'autre (Li et al., 2015). Les deux kinases partagent un site de phosphorylation consensus presque identique (Alexander et al., 2011). Nous avons donc souhaité tester si AurA régule directement la dégradation de la CycB par phosphorylation et, potentiellement, sur les mêmes sites qu'AurB. Pour cela, nous avons utilisé les lignées phosphomutantes de la CycB, pour lesquelles, 5 sites consensus pour AurB en N-terminal ont été mutés en alanine (CycB5A, non-phosphorylable) ou en acide glutamique (CycB5E, phosphomimétique), ainsi qu'un anticorps anti-phospho-CycB dirigé contre l'un de ces sites (pS157). Ces outils ont été générés et gracieusement obtenus auprès du laboratoire du Dr Huynh (Institut Curie). L'analyse par immunofluorescence de préparations de cerveaux fixés a révélé une disparition du signal de la pS157 de la CycB dans les Nb mutant *aurA* aux Kt en métaphase (Données du laboratoire : Régis Giet). Nous avons alors analysé par vidéo-microscopie en temps réel l'effet des mutations des sites consensus de phosphorylation par AurB sur la dégradation de la CycB-GFP dans les Nb. Malheureusement, en utilisant le système UAS-GAL4 pour exprimer spécifiquement les mutants dans le SNC (à l'aide du promoteur spécifique du système nerveux : 69B) nous n'avons pas réussi à obtenir un signal suffisant pour détecter la CycB dans les Nb. En revanche, le signal dans les GMC était analysable et nous n'avons observé aucune différence dans les profils de dégradation de la CycB-GFP entre les différents mutants (Figure 10).

Ces premiers résultats ne nous permettent actuellement pas de conclure mais plusieurs explications sont néanmoins envisageables. D'une part, dans nos analyses, la CycB endogène est toujours présente et cela peut perturber le mécanisme (effet dominant par rapport au mutant 5E ou 5A). Cependant, des données préliminaires obtenues avec ces mêmes lignées mutantes exprimées dans un fond génétique mutant nul *CycB* semblent donner les mêmes résultats que précédemment. D'autre part, les GMC étant différentes des Nb, il peut y avoir

une différence de régulation de la phosphorylation / dégradation de la CycB. Cela est facilement vérifiable en refaisant l'analyse des mutants CycB 5E et 5A associés cette fois avec un marqueur des chromosomes ou des Mt pour mesurer le temps de mitose des Nb. Ainsi, s'il y a un délai dans la dégradation de la CycB 5A dans les Nb, nous devrions observer une augmentation du temps de mitose.

Par ailleurs, la séquence de la CycB présente d'autres sites de phosphorylation plus ou moins consensus pour AurA qui n'ont pas été mutés. Le fait que le signal de la pS157, qui est un site consensus fort pour AurA, ne soit pas observé dans le mutant *aurA* laisse penser qu'AurA est bien capable de phosphoryler la CycB. Cependant, il est possible que dans le cas de la régulation de la dégradation de la CycB, une phosphorylation de plusieurs sites, dont certains non mutés dans les constructions 5E et 5A, soit nécessaire. Pour répondre à cela, une analyse protéomique qui viserait à identifier tous les sites de phosphorylation de la CycB serait appropriée. Cela permettra de 1) définir si d'autres sites consensus pour AurA sont phosphorylés et 2) générer de nouveaux phosphomutants pour continuer l'analyse. On peut aussi imaginer que si des phosphorylations par la kinase sont en jeu, des déphosphorylations par une ou plusieurs phosphatases doivent également intervenir pour réguler le mécanisme. Ainsi, il serait possible de tester cela en traitant les cerveaux mutants *aurA* (qui ont un déficit en activité kinase) avec un inhibiteur de phosphatase (pour limiter l'excès d'activité phosphatase) et en regardant ensuite si cela influe sur la dégradation de la CycB (réduit le délai dans le mutant *aurA*). L'analyse pourrait ensuite être complétée avec différents ARNi pour identifier quelle phosphatase (et sous-unité) est impliquée. Pour confirmer le tout, l'analyse d'un triple mutant *aurA mad2 (phosphatase identifiée)* sera nécessaire. Son cerveau devrait présenter une forte aneuploïdie et une prolifération cellulaire compromise si la réduction des activités kinases et phosphatases restaure la dégradation normale de la CycB. PP2A semble être un bon candidat et est déjà connu pour se lier à AurA (Horn et al., 2007) et déphosphoryler un de ses substrats, PAR-6 (Ogawa et al., 2009). Enfin, nous ne pouvons pas exclure que même si la CycB est bien phosphorylée par AurA, cela n'entre pas en jeu dans la régulation de sa dégradation.

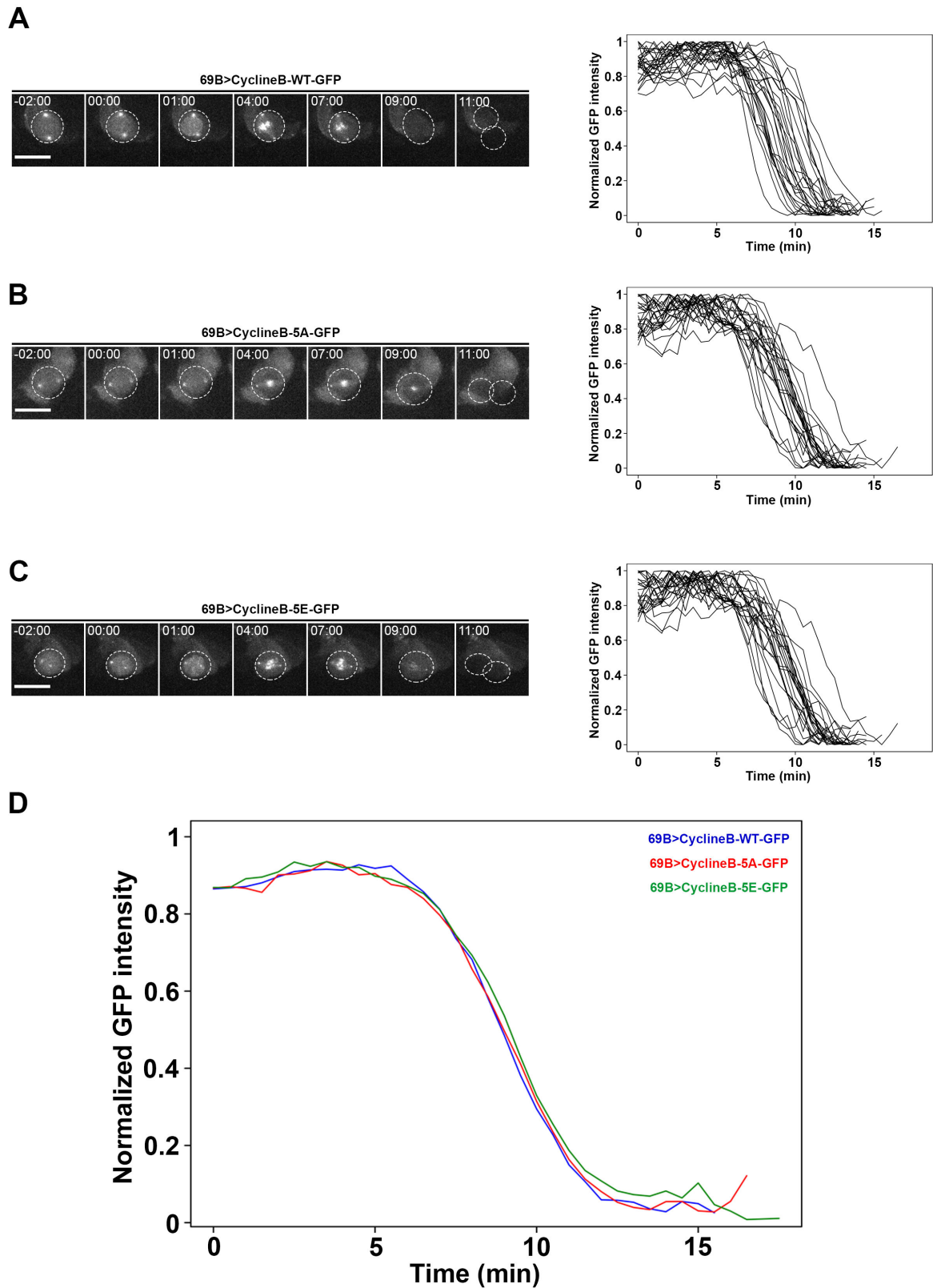


Figure 10 : la dégradation de la CycB non phosphorylable n'est pas retardée dans les GMC. (A-C) Panneaux de gauche : représentation de la division d'une GMC dans laquelle est exprimée une version sauvage de la CycB (A), une version non phosphorylable CycB 5A (B), ou une version phosphomimétique CycB 5E (C) couplée à la GFP pour mesurer la dégradation des différents mutants de la CycB. Panneaux de droite : représentation graphique des profils de dégradation de la CycB-GFP correspondant aux différents mutants (une courbe représente la mesure pour une GMC) (A) CycB-GFP (n=27) ; (B) CycB-5A-GFP (n=25) ; (C) CycB-5E-GFP (n=22). (D) Représentation des moyennes des profils de dégradation des mutants de la CycB, Bleu : CycB-GFP; Rouge : CycB-5A-GFP; Vert : CycB-5E-GFP. Le temps est indiqué en minutes, la fluorescence en unités arbitraires normalisées.

b. Hypothèse n° 2 : Une régulation de l'APC/C

Si la phosphorylation de la CycB n'entre pas directement en jeu dans la régulation de sa dégradation, il faut alors regarder plus en amont. Comme sa dégradation en sortie de mitose est dépendante de l'activité de l'APC/C, nous avons observé si la dégradation d'autres substrats de l'APC/C, la Cycline A (entrée en mitose) et la Sécurine (sortie de mitose), sont-elles aussi perturbées. Nous n'avons pas observé d'accumulation de la CycA dans le mutant *aurA* suggérant que toute l'activité de l'APC/C n'est pas perturbée mais seulement envers certains substrats (CycB). Ensuite, nous avons suivi par Western blot les niveaux protéiques de la Sécurine dans le mutant *aurA* à l'aide d'une protéine de fusion pimples (orthologue de la Sécurine chez la drosophile) couplée à une étiquette Hémagglutinine (HA) (Laboratoire de Christian Lehner). Le mutant *aurA* présente un niveau de pimples-HA plus élevé que le contrôle et comparable au niveau de la CycB (Figure 11). Cela suggère donc, comme la dégradation de deux de ses substrats est perturbée, que l'APC/C serait impliquée dans le phénotype observé. Il serait intéressant de pouvoir suivre par vidéo-microscopie en temps réel la dégradation de pimples afin de la comparer à celle de la CycB et déterminer si les deux évènements sont coordonnés et autant retardés l'un que l'autre dans le mutant *aurA*. Dans cette optique, nous avons testé une lignée exprimant la Sécurine/pimples couplée à un rapporteur GFP (Derive et al., 2015) mais sans parvenir à mesurer le signal fluorescent. Nous avons alors décidé de suivre l'activité de la Sécurine en mesurant la dégradation/disparition de l'une des protéines dégradée en réponse à la perte de la Sécurine et l'activation de la Séparase, Rad21 (une cohésine) couplée à la GFP (Oliveira et al., 2014). Dans le contrôle, le signal Rad21-GFP est présent aux Kt et disparaît juste avant l'anaphase. Dans le mutant *aurA*, les premiers résultats (à confirmer) montrent le même comportement indiquant ainsi que la Séparase n'est pas active avant l'entrée en Anaphase et suggérant donc que la dégradation de la Sécurine est retardée. Ces données, couplées aux résultats obtenus par Western blot, indiquent que le délai dans la dégradation de la CycB visible dans le mutant *aurA* est dépendant de l'activité de l'APC/C qui semble présenter un défaut d'activation seulement en fin de mitose.

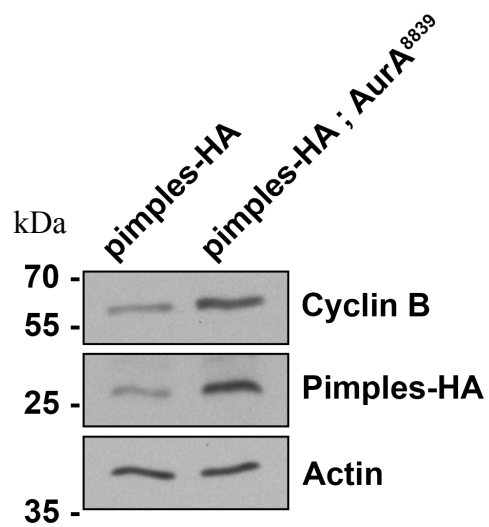


Figure 11 : Pimples-HA et la CycB sont enrichit dans le mutant *aurA*. Western blot montrant les niveaux protéiques de pimples-HA et de la CycB respectivement dans une lignée sauvage exprimant pimples-HA (ligne de gauche) ou dans le mutant *aurA*⁸⁸³⁹ exprimant pimples-HA (ligne de droite). L'actine sert de contrôle de charge. La masse moléculaire est exprimée en kDa.

Deux articles parus récemment ont traité du contrôle de l'APC/C par les phosphorylations mitotiques (Qiao et al., 2016; Zhang et al., 2016b). Les auteurs ont ainsi montré l'importance de l'état de phosphorylation de la partie N-terminale de la sous-unité APC1 dans l'activation de l'APC/C par Cdc20. La partie N-terminale d'APC1 agit comme un domaine auto-inhibiteur de la liaison de Cdc20 et sa phosphorylation en mitose lève cette inhibition et permet la liaison de Cdc20 à l'APC/C. Par ailleurs, la phosphorylation complète de ce segment requiert la liaison du complexe Cycline-Cdk à la sous-unité APC3 également phosphorylée (Zhang et al., 2016b). La perte du segment d'APC3 phosphorylé conduit à un ralentissement de l'activation de l'APC/C et un délai dans la dégradation des substrats chez le xénope (Yamaguchi et al., 2015).

Comme les phosphorylations de l'APC/C par Cdk1 et polo sont essentielles à son activation (Charles et al., 1998; Descombes and Nigg, 1998; Kotani et al., 1998; Shirayama et al., 1998), et qu'AurA est un activateur de polo, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle, l'activation de polo par phosphorylation directe par AurA pourrait être requise pour l'activation et le bon fonctionnement de l'APC/C. Nous ne pouvons pas non plus exclure qu'AurA puisse activer polo par une phosphorylation indirecte. Un article de 1998 montre que le complexe CycB-Cdk1 est requis pour l'activation de Plk1 et pour que ce dernier phosphoryle l'APC/C pour la dégradation de la CycB (Kotani et al., 1998). De plus, il a récemment démontré que CycB-Cdk1 phosphoryle Bora ce qui permet sa liaison à Plk1. Plk1 peut alors être activé par AurA pour l'entrée en mitose (Tavernier et al., 2015; Thomas et al., 2016). Une phosphorylation de la CycB par AurA serait ainsi peut-être nécessaire à l'activité de la CycB-Cdk1 et à l'activation de polo. Pour répondre à cette question, l'activité kinase du complexe CycB/Cdk1 du mutant *aurA* pourrait être testée (phosphorylation de l'histone H1). Nous pourrions également vérifier si l'expression ectopique d'un mutant phosphomimétique de la CycB dans les Nb (après identification des sites de phosphorylation par AurA) serait capable de sauver le délai de dégradation de la CycB et de la Sécurine dans le mutant *aurA*. Les expériences sont actuellement en cours.

Nous testons également différents mutants de polo (*polo¹*, *polo⁹*, *polo¹⁰*) qui présentent des Nb surnuméraires avec peu d'aneuploïdie (Castellanos et al., 2008; Llamazares et al., 1991; Sunkel and Glover, 1988; Wang et al., 2007) en combinaison avec le mutant *mad2* pour vérifier si la perte du SAC compromet ou non la prolifération de ces Nb surnuméraires et génère ou non de l'aneuploïdie en comparaison au mutant *aurA*. Nous avons également

décidé de tester si l'expression d'un mutant de polo constitutivement actif (T182D (Wang et al., 2013)), mimant une activation par AurA, serait capable de rétablir la dégradation normale de la CycB dans le mutant *aurA* après satisfaction du SAC ou entraîner sa dégradation en tout début de mitose dans le double *aurA mad2* en absence de SAC (comme visible dans le mutant *mad2*). Si c'est le cas, cela devrait générer une forte aneuploïdie dans le mutant *aurA mad2* et compromettre la prolifération des Nb surnuméraires et la formation de tumeurs (allogreffes).

Ici encore, le rôle des phosphatases serait à envisager. En effet, si une trop faible activation de l'APC/C a lieu à cause d'un manque de phosphorylation dû à l'absence d'AurA, une inhibition ou une déplétion d'une ou de plusieurs phosphatases pourrait permettre de rétablir l'équilibre et confirmer l'importance des phosphorylations par AurA dans le mécanisme. PP2A apparaît encore une fois comme une excellente candidate car elle semble jouer un rôle dans la déphosphorylation de certains substrats de Polo et de Cdk1 (Wurzenberger and Gerlich, 2011). Elle est également connue pour être impliquée dans la régulation de l'APC/C (Craney et al., 2016; Deák et al., 2003; Rossio et al., 2013).

2. Un rôle conservé ?

Mes travaux ont montré un nouveau rôle pour la kinase AurA dans le Nb chez la mouche. Il sera, par la suite, important de déterminer si ce mécanisme est conservé dans d'autres types cellulaires (hors cellules souches) et surtout s'il est aussi conservé chez l'homme. J'ai observé dans les mutants *aurA* et *aurA mad2* une forte apoptose dans le tissu épithélial qui compose les disques d'ailes (non montré). Or, les cellules de ce tissu sont connues pour être éliminées par apoptose lorsqu'elles présentent de l'aneuploïdie. Par ailleurs, une perte de la voie apoptotique leur confèrent un pouvoir tumorigène (Dekanty et al., 2012). Il serait alors intéressant, dans les mutants *aurA* et *aurA mad2*, d'inhiber l'apoptose afin de « conserver » ces cellules pour vérifier si ce tissu est alors capable d'induire la formation de tumeurs, présente de l'aneuploïdie (avec et/ou sans le SAC) et si cela est la cause du déclenchement de l'apoptose. Cela signifierait alors que le délai induit par le défaut de dégradation de la CycB, dans les cellules épithéliales des disques d'ailes, n'est peut-être pas suffisant pour permettre l'assemblage d'un fuseau correct et prévenir l'aneuploïdie. En revanche, l'apoptose peut aussi être déclenchée par un délai prolongé en métaphase (Uetake and Sluder, 2010; Vogel et al., 2004), ce qui pourrait être le cas si la perte d'AurA influe sur la dégradation de la CycB dans ce type cellulaire. Il se pourrait également qu'il n'y ait tout

simplement pas de défaut dans la régulation de la dégradation de la CycB donc, pas de délai en métaphase et donc que le rôle d'AurA est peut-être spécifique aux Nb.

Des travaux sont également en cours au laboratoire afin de déterminer si le mécanisme est conservé chez l'homme. Pour cela, des lignées cellulaires sont traitées avec des inhibiteurs ou siARN contre AurA ou Polo et associés à l'inhibition de Mad2 ou Mps1 (pour supprimer le SAC) ainsi qu'à des drogues du fuseau afin d'en observer les effets.

Il est intéressant de noter qu'une étude parue en 2009 suggère que l'inhibition d'AurA abroge le délai en mitose induit par des drogues du fuseau (Wysong et al., 2009). Les résultats ne montrent cependant pas de lien direct entre AurA et le SAC mais suggèrent seulement que la perte d'AurA favorise l'échappement du blocage. De plus, l'analyse se base sur l'utilisation d'inhibiteurs d'AurA et les auteurs considèrent que l'activité kinase est complètement inhibée quand il y a disparition du signal pT288. Or, il peut toujours y avoir une activité résiduelle non détectable et suffisante pour permettre la dégradation de la CycB car une faible activité kinase AurA ne retarde que peu cette dégradation dans le Nb (Figure 4b de l'article). AurA est également capable de jouer son rôle de kinase en absence de la pT288 (voir introduction). Ces résultats laissent penser que les régulations en jeu et les effets sont peut-être différents entre espèces et types cellulaires.

3. Impact sur les traitements anticancéreux

Si le rôle d'AurA sur la dégradation de la CycB est conservé chez l'homme dans certains, sinon dans tous les types cellulaires, cela pourrait avoir un impact sur l'utilisation, dans les traitements anti-cancer, d'inhibiteurs d'AurA (D'Assoro et al., 2016). En effet, si l'inhibition de la kinase entraîne un défaut de dégradation de la CycB et un délai en métaphase indépendant du SAC en cellule humaine, il serait probablement peu efficace de l'associer avec un inactivateur du SAC pour induire une forte aneuploïdie dans les tumeurs chez les patients. Le maintien de haut niveau de CycB permettrait alors aux cellules d'assembler un fuseau suffisant pour ségréger leurs chromosomes, pouvant même conduire à la génération d'une faible aneuploïdie et à l'apparition de résistances ou de nouvelles tumeurs. Un essai clinique de phase II d'un inhibiteur d'AurA (alisertib) associé au taxol (activation du SAC) est actuellement en cours contre le cancer du poumon à petites cellules (NCT02038647). Si l'inhibition d'AurA en cellule humaine entraîne un délai en mitose

indépendant du SAC comme nous l'avons observé chez la drosophile, l'association des deux molécules pourrait n'avoir aucun effet bénéfique ou même être délétère pour les patients. Cette étude apportera donc certains éléments de réponse.

Ainsi, mon travail permet d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherches quant au rôle d'AurA en cellules humaines ainsi que des éléments à prendre en compte pour les prochaines études cliniques sur d'autres types de cancers en cas d'échec ou de réussite de ces études. L'alisertib donne de meilleurs résultats contre les tumeurs solides comparées aux leucémies (Dominguez-Brauer et al., 2015) et nos résultats devraient apporter de nouvelles pistes permettant d'expliquer cette différence et ainsi pouvoir mieux comprendre la biologie des tumeurs et développer de nouvelles thérapeutiques ciblées.

Il est donc important de poursuivre notre étude en se focalisant sur différentes lignées cellulaires/cancers afin de déterminer si AurA joue un rôle dans la dégradation de la CycB également chez l'homme et si ce mécanisme est ubiquitaire ou spécifique de certains types cellulaires afin de pouvoir développer et adapter de nouveaux traitements anticancéreux. Mon travail permettra également de renforcer l'état des connaissances sur les mécanismes mis en jeu pour la régulation de la sortie de mitose.

Annexes

Ensconsin/Map7 promotes microtubule growth and centrosome separation in *Drosophila* neural stem cells

Emmanuel Gallaud,¹ Renaud Caous,¹ Aude Pascal,¹ Franck Bazile,² Jean-Philippe Gagné,⁴ Sébastien Huet,³ Guy G. Poirier,⁴ Denis Chrétien,² Laurent Richard-Parpaillon,¹ and Régis Giet¹

¹Cytoskeleton and Cell Proliferation, ²Tubulin and Interacting Proteins, and ³Spatio-temporal Regulation of Transcription, Biosit, Université de Rennes 1, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 6290, 35043 Rennes, France

⁴Centre de Recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec, Pavillon CHUL, Université Laval, Québec City, Québec G1V 0A6, Canada

The mitotic spindle is crucial to achieve segregation of sister chromatids. To identify new mitotic spindle assembly regulators, we isolated 855 microtubule-associated proteins (MAPs) from *Drosophila melanogaster* mitotic or interphasic embryos. Using RNAi, we screened 96 poorly characterized genes in the *Drosophila* central nervous system to establish their possible role during spindle assembly. We found that Ensconsin/MAP7 mutant neuroblasts display shorter metaphase spindles, a defect caused by a reduced microtubule polymerization rate and enhanced by centrosome ablation. In agreement with a direct effect in regulating

spindle length, Ensconsin overexpression triggered an increase in spindle length in S2 cells, whereas purified Ensconsin stimulated microtubule polymerization *in vitro*. Interestingly, *ensc*-null mutant flies also display defective centrosome separation and positioning during interphase, a phenotype also detected in kinesin-1 mutants. Collectively, our results suggest that Ensconsin cooperates with its binding partner Kinesin-1 during interphase to trigger centrosome separation. In addition, Ensconsin promotes microtubule polymerization during mitosis to control spindle length independent of Kinesin-1.

Introduction

During mitosis, the mitotic spindle plays a crucial role in ensuring the correct segregation of chromosomes. One of the principal challenges faced by the cell during mitosis is the assembly of a powerful microtubule (Mt)-based machine mediating the efficient segregation of sister chromatids within a few minutes. Because of their role in defining the plane of cell division, mitotic Mts are also essential for brain homeostasis, a process linked to asymmetric stem cell division (Caussinus and Gonzalez, 2005; Wodarz and Näthke, 2007; Neumüller and Knoblich, 2009). The assembly of the spindle is complex and tightly regulated. The association of Mt-associated proteins (MAPs) with Mts and their subsequent dissociation play an essential role in mitotic spindle assembly. Mitotic spindle assembly and

chromosome segregation thus require the complex spatial and temporal regulation of MAPs (Gadde and Heald, 2004).

Many MAPs have been identified in various model organisms. These proteins can be classified into two main categories: motor and nonmotor proteins. Through their direct effects on Mt dynamics, Mt sliding, and cross-linking, these MAPs are involved in several steps in mitosis: centrosome separation and positioning, the attachment of Mts to kinetochores (Kts), bipolar spindle formation, chromosome motion, and cytokinesis (Walczak and Heald, 2008). Mt polymerization is promoted by MAPs, such as TOGp/MAP215/msps (Cullen et al., 1999; Tournebize et al., 2000; Cassimeris and Morabito, 2004), and Mts are organized into a fusiform structure by motor proteins (Sawin et al., 1992; Wittmann et al., 1998; Goshima et al., 2005). Spindle size is controlled by the coordinated regulation of Mt end-binding proteins, such as CLASPs, depolymerizing

Correspondence to Régis Giet: regis.giet@univ-rennes1.fr

Abbreviations used in this paper: CNS, central nervous system; dsRNA, double-stranded RNA; EHR, Ensconsin homology region; GMC, ganglion mother cell; Khc, kinesin heavy chain; Kt, kinetochore; LC-MS/MS, liquid chromatography/tandem mass spectrometry; MAP, Mt-associated protein; Mt, microtubule; Nb, neuroblast; NEBD, nuclear envelope breakdown; SAC, spindle assembly checkpoint; WT, wild type.

© 2014 Gallaud et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons license (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2014/03/27/jcb.201311094.DC1.html>

kinesins, and the Mt minus end protein known as patronin (Gaetz and Kapoor, 2004; Maiato et al., 2004, 2005; Laycock et al., 2006; Goodwin and Vale, 2010).

This study focuses on Ensconsin/MAP7. We demonstrate, for the first time, the occurrence in *Drosophila melanogaster* neuroblasts (Nbs) of Ensconsin/MAP7-dependent interphase centrosome separation and spindle assembly pathways during mitosis.

Results and discussion

Ensconsin is a general MAP required for mitotic spindle assembly in the fly central nervous system (CNS)

We analyzed the *Drosophila* Mt interactome from 0–2-h-old embryos, which are characterized by rapid, synchronous cell divisions (mitotic embryos), with the goal of identifying new spindle assembly proteins. In parallel, we also investigated the Mt interactomes of older embryos (2–17 h old), in which most Mts have nonmitotic functions. Mt polymerization was induced by incubation with taxol, and the MAPs and Mts were harvested by centrifugation and resolved by SDS-PAGE (Fig. S1, A and B). We applied a high-throughput proteomics approach, leading to the high-confidence identification of 855 proteins in both samples (Fig. S1, C–E; and Table S2). Using spectral count, a semiquantitative measurement of protein abundance, we classified all the proteins identified as mitotic, general, or interphasic MAPs on the basis of their enrichment profiles (Materials and methods).

We investigated the possible role in spindle assembly in vivo of 96 poorly characterized genes by applying RNAi to the fly CNS (Table S3 and Fig. S1 F; Dietzl et al., 2007; Mummery-Widmer et al., 2009; Neumüller et al., 2011). The new putative mitotic genes identified by this approach (Fig. S1 G and Table S1) included *Ensconsin* (CG14998). We used *ensc* mutants to investigate the role of this gene in mitotic spindle assembly (Fig. 1 B, bottom). We used three known *Ensconsin* mutant alleles: *ensc* Δ C (C-terminal deletion), *ensc* Δ N (N-terminal deletion), and *ensc* Δ Null (full deletion, hereafter referred to as *ensc*; Sung et al., 2008). Western blot analyses showed all three mutant strains to have similar low levels of Ensconsin protein (see Fig. S3 A).

ensc mutants had small brain lobes (Fig. 1 A) and a higher mitotic index ($1.2 \pm 0.5\%$ in wild-type [WT] brains and $2.6 \pm 1.0\%$ in *ensc* mutant brains; $n > 3,000$ cells, 6 brains), which suggests that *ensc* mutation caused a mitotic delay due to prolonged spindle assembly checkpoint (SAC) activation. We tested this hypothesis with the double knockdown of Ensconsin and the SAC protein Mad2 by RNAi, with confirmation of the depletion of the protein (Fig. S2 A). Kt/Mt attachment defects were revealed by the large numbers of lagging chromatids during anaphase in double RNAi (6/30 anaphases) but not in cells subjected to *mad2* or *ensc* RNAi ($n > 40$ anaphases; Fig. S2, B and C). In addition, flies producing double-stranded RNAs (dsRNAs) for either *Ensconsin* or *Mad2* were viable, whereas flies producing both these RNAs died. This indicates that the SAC is required to prolong mitosis and to correct deleterious Kt–Mt attachment.

Ensconsin and Kinesin-1 mutant Nbs display similar centrosome separation defects during interphase

A close examination of *ensc* mutant Nb spindles revealed that the centrosomes were not fully separated at prophase (Fig. 1 B, top; $n = 20/91$) and that metaphase spindles were shorter than WT spindles (Fig. 1 B, bottom; $n > 300$ spindles).

Time-lapse imaging of dividing Nbs producing a GFP-tagged β -tubulin showed the time between nuclear envelope breakdown (NEBD) and anaphase onset to be 6.1 ± 0.9 min in WT cells and 8.0 ± 1.2 min in *ensc* mutants, which is consistent with SAC activation (Fig. 1, C and D, top; and Videos 1–3). We also confirmed that mean spindle length was significantly shorter in *ensc* mutants (8.2 ± 0.7 μ m) than in the WT (10.7 ± 0.7 ; Fig. 1 D, bottom).

In *Drosophila* Nbs, unlike most cell types, the centrosomes split and start to separate immediately after cytokinesis (Rebollo et al., 2007; Rusan and Peifer, 2007). The daughter centrosome is immobile, retains Mt nucleation activity, and is connected to the apical cortex, whereas the mother centrosome displays weak Mt nucleation and migrates to the opposite side of the cell. The mother centrosome organizes a second aster shortly before mitosis. The daughter centrosome is therefore inherited by the Nb and the mother centrosome is inherited by the ganglion mother cell (GMC; Conduit and Raff, 2010; Januschke et al., 2011). The angle between the Mt asters before NEBD reflects the efficacy of centrosome separation. It was found to be abnormally low in *ensc* mutants (Fig. 1 E, top; and Fig. 1 F; see also Video 2), for which 14% of Nbs presented mispositioned asters during prophase (Fig. 1 E, bottom; and Video 3). The mother centrosome is not visible (by GFP-tubulin staining methods) before NEBD. We therefore imaged Nbs expressing YFP-labeled centrosomes and GFP-labeled Mts between two consecutive mitoses (Rebollo et al., 2007; Januschke and Gonzalez, 2010). Centrosome splitting after cytokinesis was normal in *ensc* mutants, but the separation was incomplete, resulting in the apparent separation defect detected before NEBD (Fig. 2 A, interphase; and Videos 4 and 5). We observed no monopolar spindle formation, which suggests that the machinery required to separate centrosomes at NEBD is functional (Tanenbaum and Medema, 2010). However, due to the late timing of separation, when the mother centrosome started to nucleate Mts at NEBD, it was often anchored to the apical cortex in place of the daughter centrosome and was therefore inherited by the Nb (8/25; Fig. 2 A and Video 5, green line).

Ensconsin is a coactivator of Kinesin-1 in interphase. We therefore investigated whether centrosome separation defects could be also detected after a loss of Kinesin-1 function (Sung et al., 2008; Metzger et al., 2012; Barlan et al., 2013). We found centrosome separation defects in *khc*²⁷/*khc*⁶³ mutant brains, which lead to a small angle between centrosomes at NEBD but have no effect on spindle assembly (Fig. 2, B–E; and Videos 6 and 7). Centrosome inheritance was randomized and, in 50% of subsequent mitoses, the daughter centrosome ended up in the GMC (Fig. 2 D, bottom). These data demonstrate that early centrosome separation after cytokinesis is a prerequisite for correct centrosome segregation, a process in which Ensconsin and Kinesin-1

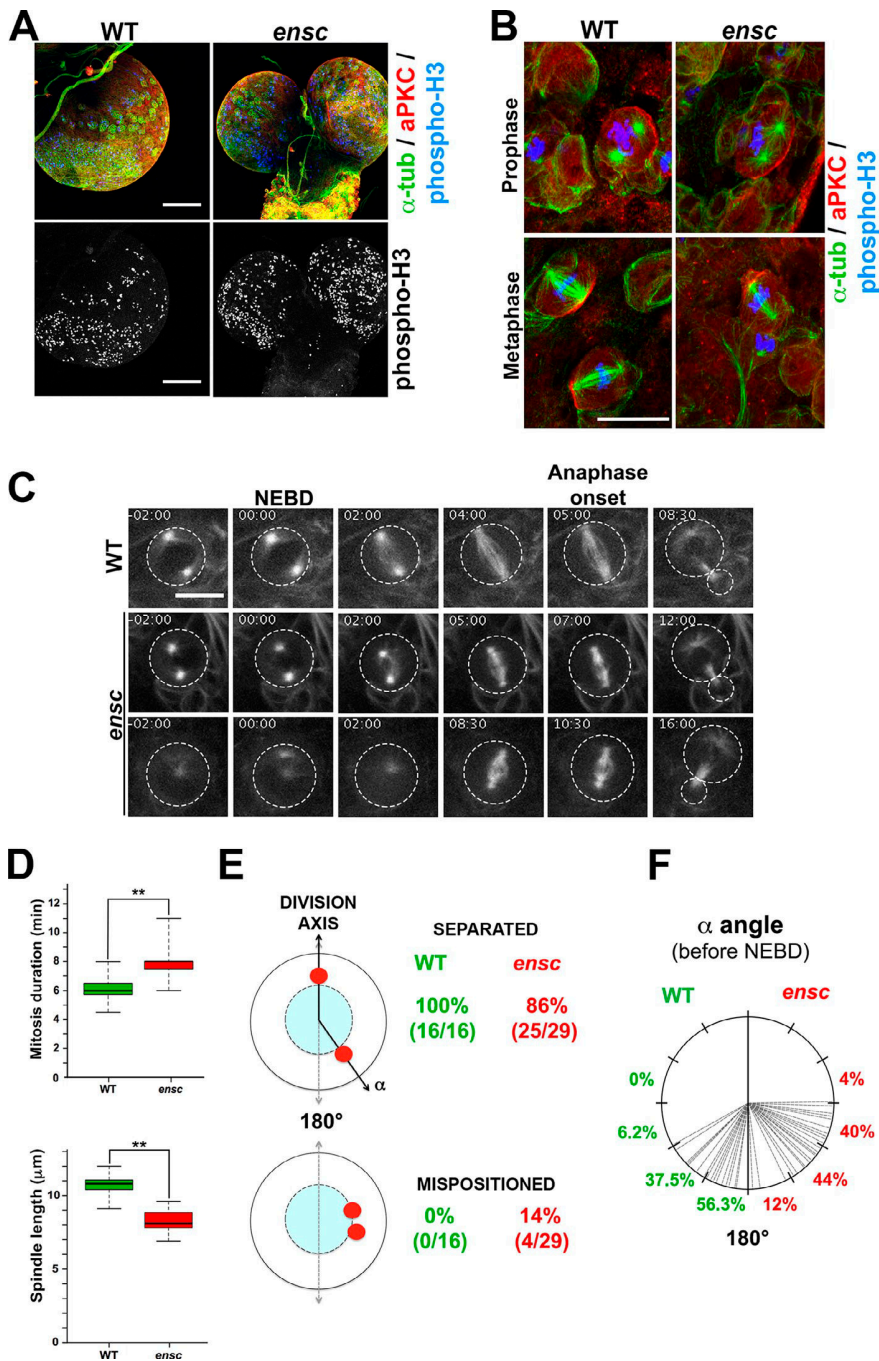


Figure 1. *ensc* mutant Nbs display centrosome separation defects and shorter metaphase spindles. (A) Overview of the optic lobes in WT and *ensc* mutant flies. *ensc* mutant larvae have small lobes and elevated numbers of mitotic cells. (B) Mitotic cells from WT or *ensc* mutant brains. A centrosome separation defect is detected in $\sim 15\%$ of the *ensc* mutant prophase cells (top). *ensc* mutant metaphase spindles are shorter (bottom) than those in WT Nbs. aPKC is shown in red, tubulin in green, and phospho-histone H3 Ser10 in blue (gray in the bottom of A). Bars: (A) 100 μ m; (B) 10 μ m. (C) Dividing WT (top and Video 1) and *ensc* mutant (middle and bottom, and Videos 2 and 3) Nbs expressing β -tubulin-GFP. Note the mitotic delay in the *ensc* mutant, the shorter spindles, and the centrosome-positioning defect (bottom). Time is given in minutes:seconds. 00:00 corresponds to NEBD. The circles indicate the contours of the cells. Bar, 10 μ m. (D) Analyses of the duration of mitosis (top) and spindle length (bottom) in WT (green) and *ensc* mutant (red) Nbs. Mitosis lasted 6.1 ± 0.9 min in the WT ($n = 23$) and 8.0 ± 1.2 min in the mutant ($n = 37$; **, $P = 1.10 \times 10^{-7}$). Spindle length was 10.7 ± 0.7 μ m in the WT ($n = 15$) and 8.2 ± 1.2 μ m in *ensc* mutants ($n = 23$; **, $P = 1.10 \times 10^{-7}$). (E) Analysis of centrosome separation in WT (green) and *ensc* mutant (red) Nbs at NEBD. 14% of *ensc* mutants display incomplete centrosome separation and severe mispositioning (Video 3). In the other cases (Video 2), the angle between the centrosomes relative to the center of the nucleus is measured (F). In WT, 93.8% of prophase cells have their basal centrosome oriented between 120° and 180° . In *ensc* mutants, only 56% of the cells position their centrosome in this region and 44% of the cells show an angle between 60° and 120° .

appear to be key players. Interestingly, spindle size and mitotic timing were normal in kinesin heavy chain (Khc)-depleted and mutant Nbs, which indicates a dependence of the short spindle phenotype on Enscinsin but not Kinesin-1 (Fig. 2 D).

Enscinsin is required for Mt growth in mitotic *Drosophila* Nbs

We analyzed the mitotic defects of the *ensc* mutants in detail by fully depolymerizing mitotic spindles from WT and *ensc* Nbs by cold treatment and monitoring Mt regrowth at 25°C (Fig. 3 A). In control tests, we observed large centrosomal asters 30 s after the return to 25°C conditions (Fig. 3 B, left, red arrows; $n = 19$).

We also detected asters around the main chromosome mass and discrete Kt fibers (Fig. 3 B, white arrows). At 90 s, the WT spindles had a normal, bipolar shape ($n = 25$). The *ensc* mutant Nbs displayed weak aster formation around the chromosomes and no obvious Kt fibers after 30 s ($n > 30$; Fig. 3 B, right). After 90 s, only short spindles with weak, disorganized Mt arrays were present ($n = 24$). Overall, our results suggest that Enscinsin contributes to the polymerization of spindle Mts. For confirmation of this role, we quantified Mt growth directly by tracking EB1-GFP comets at Mt plus ends in WT and *ensc* Nbs (Fig. 3 C and Video 8). Measurements of Mt dynamic parameters revealed that the mean rate of Mt polymerization was significantly lower

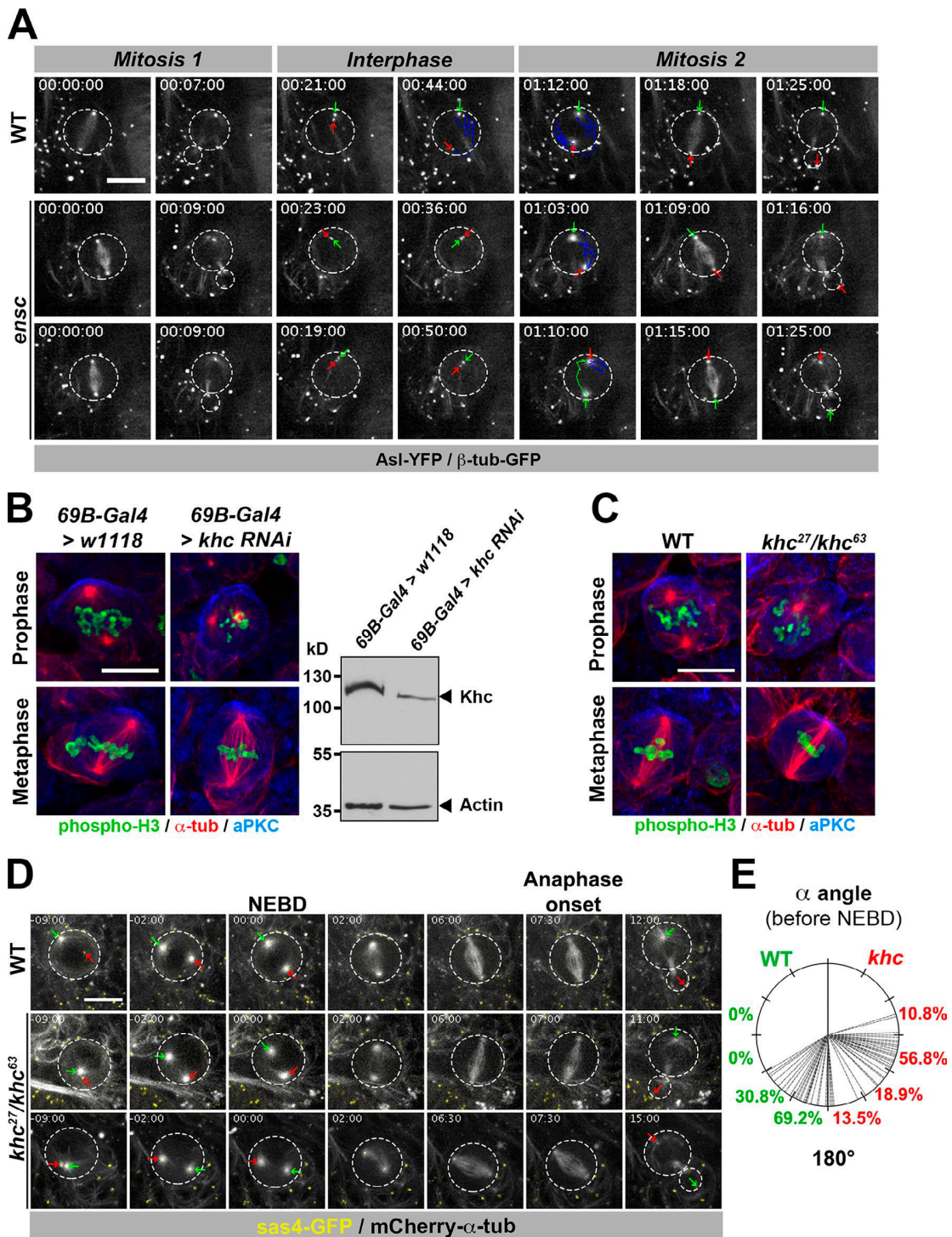


Figure 2. Centrosome separation is defective in *kinesin-1* and *ensc* mutant Nbs. (A) WT (top and Video 4) and *ensc* mutant (middle, bottom, and Video 5) Nbs expressing YFP-AsI (to label the centrosomes) and GFP-tubulin (to follow the daughter centrosome and Mts) were analyzed by time-lapse video microscopy. The green and blue lines follow the trajectories of the daughter and mother centrosomes, respectively. The two centrosomes did not separate fully in *ensc* mutants. For this reason, in several cases (8/25, 32%), when the mother centrosome acquired its Mt nucleation potential, it was attached to the apical cortex in place of the daughter centrosome, and was therefore inherited by the Nb rather than the GMC. (B) Prophase and metaphase in control or *khc* RNAi-treated Nbs (left) and Western blot analyses of Khc (top) and actin (bottom) after *khc* or control RNAi (right). (C) Prophase and metaphase in WT and *khc²⁷/khc⁶³* mutant Nbs. In B and C, tubulin is shown in red, aPKC in blue, and phospho-histone H3 Ser10 in green. (D) Duration of mitosis and centrosome positioning in WT and *khc²⁷/khc⁶³* mutant Nbs expressing Sas4-GFP (yellow) and Cherry-tubulin (gray). Mitosis lasted 7.2 ± 1.2 min in WT ($n = 27$) and 7.5 ± 1.5 min in *khc²⁷/khc⁶³* ($n = 48$) cells. $P = 0.652$. Spindle length was 10.9 ± 0.8 μ m in WT cells and 11.3 ± 1.8 μ m in *khc²⁷/khc⁶³* mutant cells. The daughter centrosome was inherited by the GMC in 24 of the 48 *khc²⁷/khc⁶³* mutant cells (50%). Time is given in hours:minutes:seconds. In A and D, the green and the red arrows indicate the daughter and mother centrosomes, respectively. The circles indicate the contours of the cells. Bars, 10 μ m. (E) Analysis of centrosome separation angle in WT (green) and *khc²⁷/khc⁶³* (red) Nbs at NEBD.

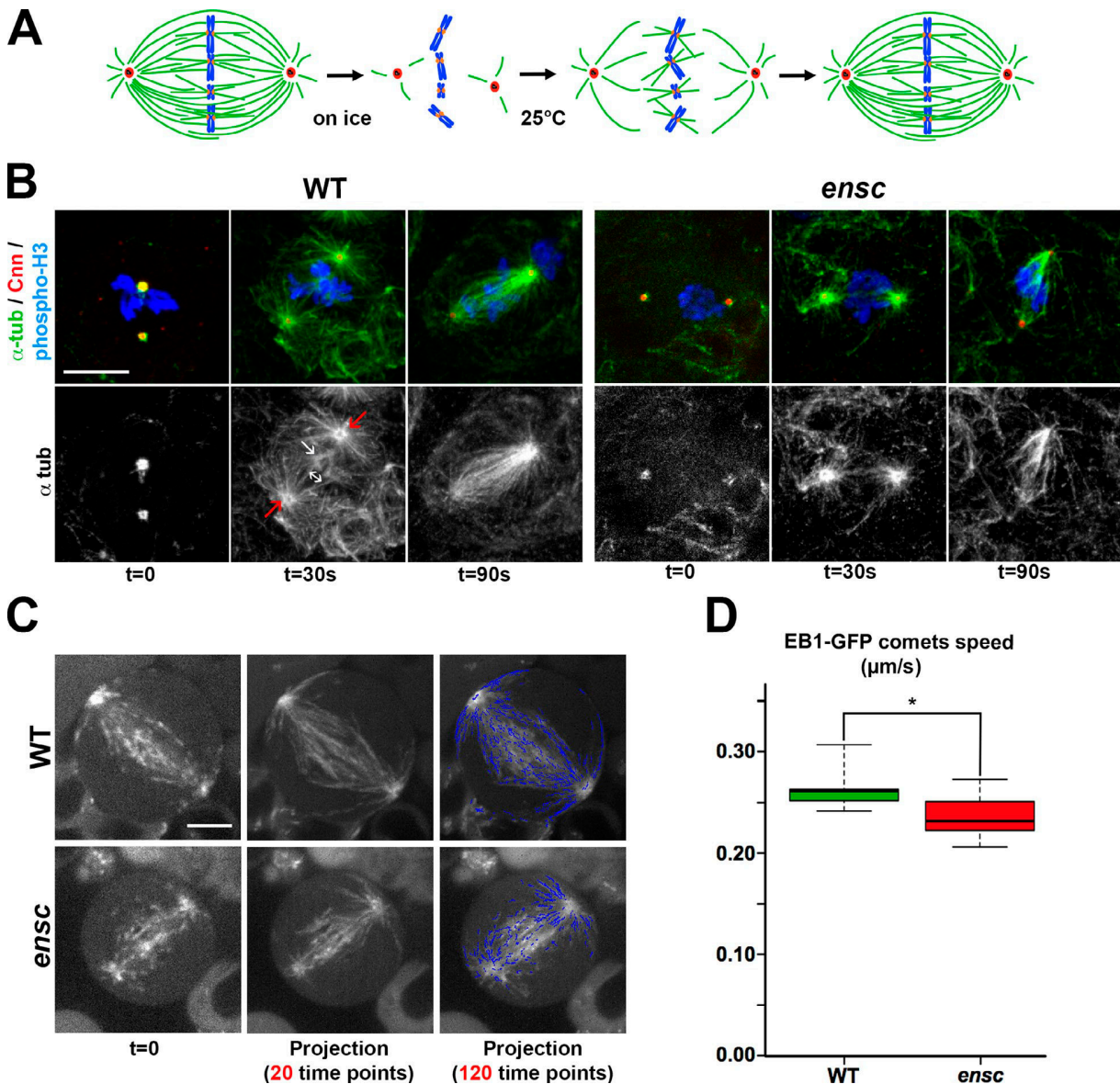


Figure 3. *Enscin* mutant Nbs display defective spindle reassembly and a lower Mt velocity in live cells. (A) Mt regrowth assay. Mts were depolymerized on ice (see Materials and methods), and spindle reformation was analyzed by immunostaining after the cells had been returned to 25°C conditions. (B) In the WT (left), Mts were depolymerized after 30 min at 0°C. Numerous Mts were nucleated by the centrosomes after 30 s at 25°C (red arrows). Small asters are visible around the chromatin (white arrow), together with Kt fibers (double-ended arrow). At 90 s, the spindles have a normal shape. In *ensc* mutant cells (right), only centrosomal Mts can be visualized after 30 s, and the spindles remain short and disorganized after 90 s. Centrosomes are shown in red (centrosomin, *cnn*), Mts (α tub) in green (gray in the lower panels), and phospho-H3 in blue. Bar, 10 μm . (C) Control (top) and *ensc* (bottom) Nbs expressing EB1-GFP were imaged by time-lapse microscopy (Video 8). A single frame (in which EB1-GFP comets are visible) is presented (left), with time projections for the 20- and 120-min time points (middle and right, respectively). Blue lines represent EB1-GFP tracks after filtering (see Materials and methods). Bar, 4 μm . (D) Quantification of Mt velocity in WT ($n = 17$) and *ensc* mutant ($n = 16$) mitotic Nbs: 0.26 and 0.23 $\mu\text{m/s}$, respectively (*, $P = 1.2 \times 10^{-4}$).

(reduced by 12%) in the *ensc* mutant than in WT Nbs (Fig. 3 D), a difference sufficient to account for the short spindles observed in *ensc* mutants.

Spindle shortening and the duration of mitosis in the Nbs of *ensc* mutants are greater in the absence of centrosomes

Given the large number of short Mts nucleated by the centrosomes in the regrowth assay, we investigated whether the spindle formation defects observed in *ensc* mutants were greater in

the absence of centrosomes. We therefore generated *ensc* and *sas-4^{s2214}* double mutant flies, the *sas-4* gene being required for centrosome duplication (Basto et al., 2006), and monitored cell division (Fig. 4). In *sas-4^{s2214}* single mutants (Video 9, left), the spindle formed without centrosomes and mitosis lasted 9.0 ± 1.2 min (Fig. 4, A and C). In *ensc, sas-4^{s2214}* double mutants (Video 9, right), mitosis lasted significantly longer (10.1 ± 1.2 min) and the distribution of Mts was more strongly affected than in the single mutant (Fig. 4, A and C). The spindles were much shorter in the double mutant (6.7 ± 0.6 μm) than in the

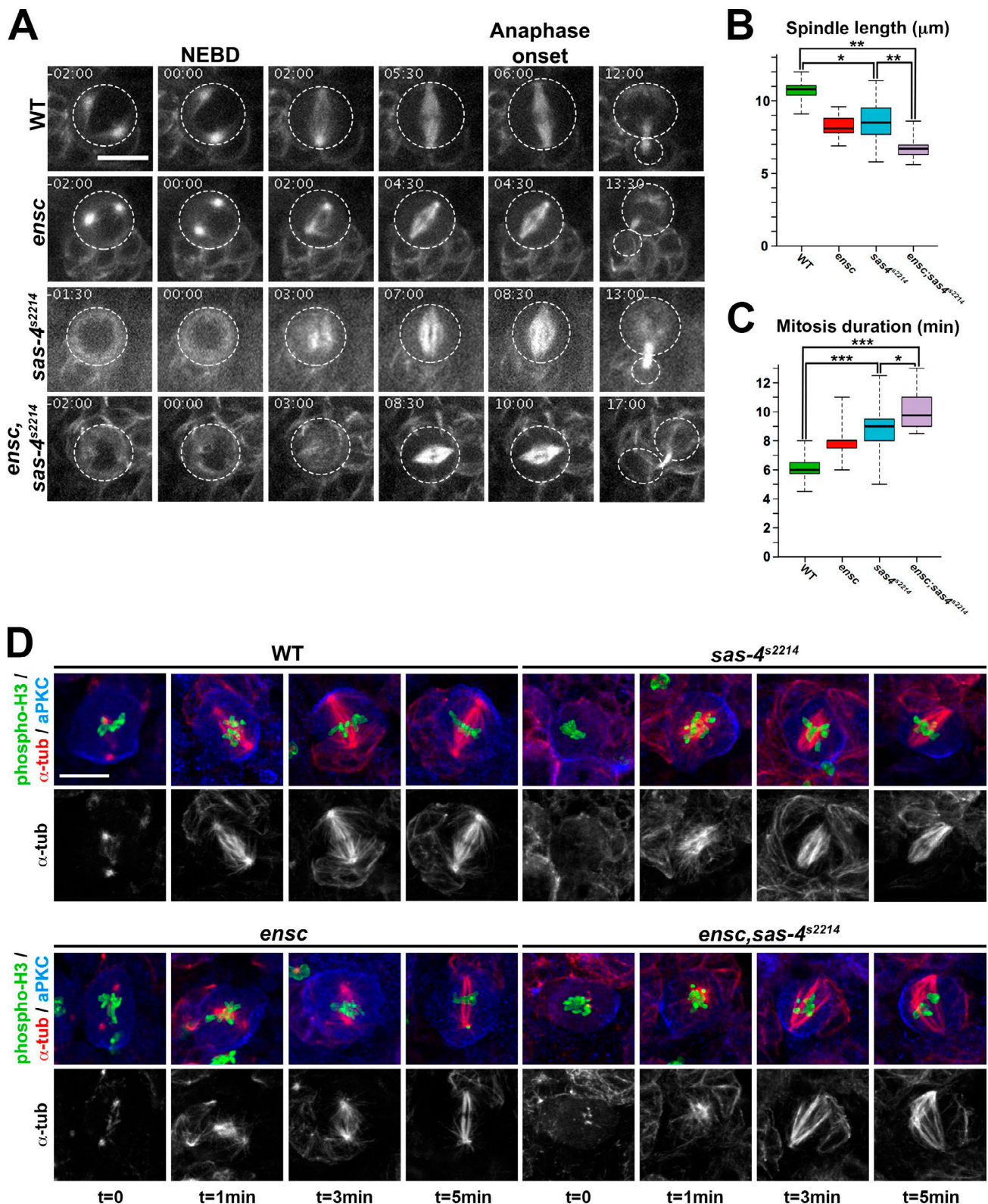


Figure 4. Enconsin-dependent spindle assembly defects are enhanced by centrosome ablation. (A) Cell division of WT, *ensc*, *sas-4^{s2214}*, and *ensc, sas-4^{s2214}* double mutant Nbs expressing β-tubulin-GFP. Time is given in minutes:seconds. The circles indicate the contours of the cells. Bar, 10 μm. (B) Analysis of mitotic spindle length in WT (green), *ensc* (red), *sas-4^{s2214}* (blue), and *ensc, sas-4^{s2214}* (purple) mutant Nbs. Spindle length was 10.7 ± 0.7 μm in the WT ($n = 15$), 8.2 ± 1.2 μm in the *ensc* mutant ($n = 23$), 8.5 ± 1.4 μm in the *sas-4^{s2214}* mutant ($n = 45$), and 6.7 ± 0.7 μm in the *ensc, sas-4^{s2214}* double mutant ($n = 31$). *, $P = 2 \times 10^{-6}$; **, $P < 5.2 \times 10^{-8}$. (C) Analysis of the duration of mitosis in WT (green), *ensc* (red), *sas-4^{s2214}* (blue), and *ensc, sas-4^{s2214}* (purple) mutant Nbs. The time between NEBD and anaphase onset was 6.1 ± 0.9 min for the controls ($n = 23$), 8.0 ± 1.2 min for the *ensc* mutant ($n = 37$), 9.0 ± 1.2 min for the *sas-4^{s2214}* mutant ($n = 48$), and 10.0 ± 1.2 min for the *ensc, sas-4^{s2214}* double mutant ($n = 38$). *, $P = 1.8 \times 10^{-3}$; ***, $P < 1 \times 10^{-10}$.

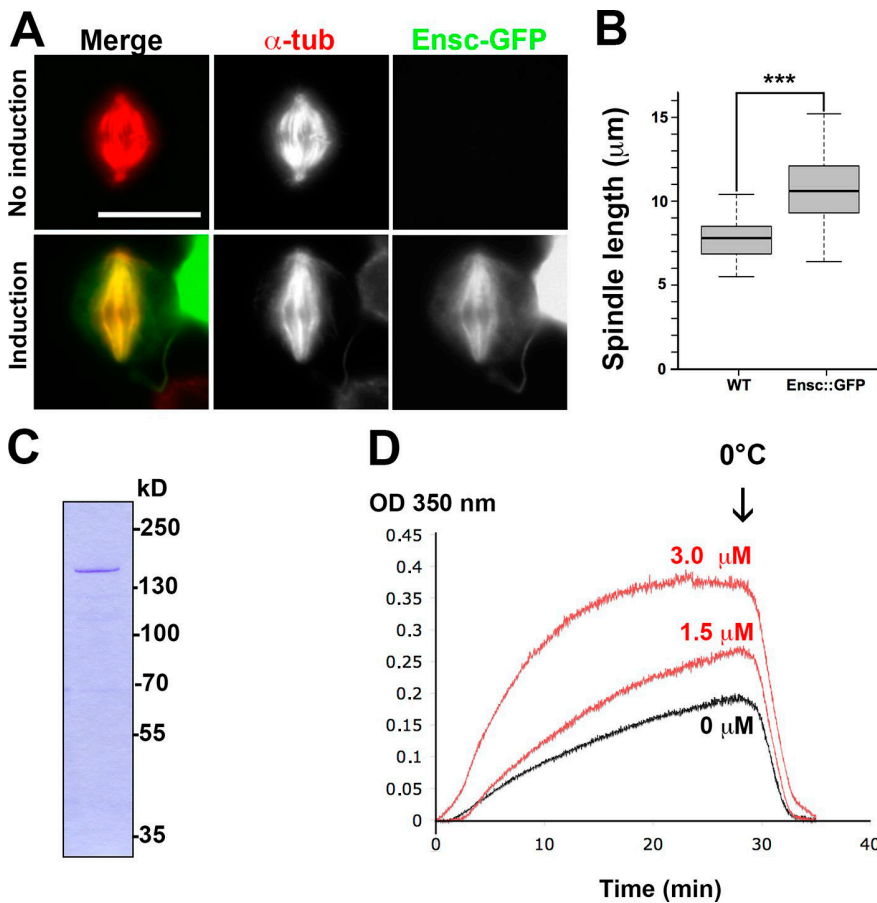


Figure 5. Enscinsin promotes Mt growth in cells and in vitro. (A) Enscinsin (Ensc) overproduction in mitotic S2 cells led to the formation of longer spindles. Enscinsin-GFP is green (gray in the panels on the right) and Mts are shown in red (gray in the middle panels). Exogenous Enscinsin-GFP is localized on the mitotic spindle during mitosis. Bar, 10 μm . (B) Analysis of mitotic spindle length in WT ($n = 56$) and Enscinsin-GFP-overexpressing mitotic S2 cells ($n = 26$). $***, P = 5.1 \times 10^{-11}$. (C) Recombinant Enscinsin purified, separated by SDS-PAGE, and stained with Coomassie blue. (D) Effect of Enscinsin on Mt polymerization in vitro. Purified porcine brain tubulin was mixed with polymerization buffer supplemented with either PBS or PBS containing Enscinsin on ice. Mt polymerization was induced by heating at 35°C. Absorbance at 350 nm was monitored to evaluate the formation of Mt polymers. After 28 min, the samples were shifted to 0°C to estimate protein aggregation. Enscinsin increased the rate of Mt polymerization and the total number of polymers in a dose-dependent manner (red curves), as shown by comparison with buffer alone (black curve).

sas-4^{s2214} ($8.5 \pm 1.4 \mu\text{m}$) and *ensc* single mutants ($8.0 \pm 0.6 \mu\text{m}$; Fig. 4 B). In parallel, we repeated the Mt regrowth assay (Fig. 4 D). 1 min after the return to 25°C, long Mts were seen in the WT and the *sas-4^{s2214}* single mutant, but not in the *ensc* single mutant and the *ensc,sas-4^{s2214}* double mutant. Bipolar spindle assembly occurred within 3 min in flies lacking either *sas-4^{s2214}* or *enscinsin*, but was severely compromised in the double mutant. These results suggest that the centrosome favors spindle assembly when Mt polymerization rates are low in mitotic *ensc* mutant cells.

Enscinsin is a mitotic spindle-associated protein that stimulates Mt growth in S2 cells and in vitro

We analyzed the distribution of Enscinsin by staining dividing *Drosophila* embryos with purified antibodies. Enscinsin colocalized with the mitotic apparatus during early development (Fig. S3 B). Furthermore, studies of a functional *Drosophila* line ubiquitously expressing the GFP-tagged Enscinsin confirmed the colocalization of Enscinsin-GFP with the Mt network

and the mitotic spindle during Nb cell division and in early embryos (Fig. S3, C and D; and Video 10).

Consistent with the Enscinsin-dependent stimulation of Mt growth during M phase, S2 cells with higher Enscinsin levels formed longer spindles ($10.9 \pm 2.1 \mu\text{m}$, $n = 26$) than control cells ($7.8 \pm 1.0 \mu\text{m}$, $n = 56$; Fig. 5, A and B). In a complementary experiment, we assessed the impact of Enscinsin activity on Mt polymerization in vitro, using purified porcine brain tubulin and recombinant Enscinsin (Fig. 5 C) in a turbidity assay, to determine whether this protein could modify the Mt polymerization rate in vitro (Weis et al., 2010; Gaskin, 2011). Enscinsin stimulated Mt polymerization in a dose-dependent manner (Fig. 5 D). This function is entirely consistent with a lower Mt velocity in the deletion mutant and with a longer spindle length in conditions of Enscinsin overexpression.

In conclusion, our study reveals a dual role for Enscinsin. First, during interphase, this protein promotes centrosome separation and positioning through cooperation with its binding partner, Kinesin-1. Second, it stimulates Mt growth during mitosis, independent of Kinesin-1.

(D) Mt regrowth assay in WT, *ensc*, *sas-4^{s2214}*, and *ensc,sas-4^{s2214}* mutant Nbs. 1 and 3 min after the return to 25°C, numerous long Mts were detected in *sas-4^{s2214}* Nbs. In the *ensc,sas-4^{s2214}* double mutant, short Mts were found closely apposed to the mitotic chromatin mass. At 5 min, the spindles resembled Mt bundles rather than the bipolar structure seen in *sas-4^{s2214}* mutants. αPKC is shown in blue, Mts ($\alpha\text{-tub}$) are shown in red (and gray), and phospho-H3 is shown in green. Bar, 10 μm .

Human Enscn/Map7/EMAP115 was first discovered two decades ago, and was described as a MAP that “ensconces” on Mts (Bulinski and Bossler, 1994). The data presented here reveal previously unidentified roles for this known MAP in the regulation of mitotic and interphase Mt-based processes. Further studies are required to determine how a single MAP can contribute to such different activities during the cell cycle.

Materials and methods

Mt co-sedimentation assay

Canton-S fly populations were amplified, maintained, and fed in population cages with fresh yeast on agar plates twice daily for 5 d. We collected 0–2-h-synchronized embryos, a time period corresponding to syncytial division. In parallel, flies were allowed to lay eggs for 15 h and the collected embryos were left for an additional 2 h to allow the last embryos laid to reach the blastula stage. This protocol discriminates between the dividing/mitotic and differentiating/interphase stages. We disrupted 1 g of mitotic and interphase embryos by passage through a French press in a total volume of 2 ml of lysis buffer (LB: 20 mM Hepes, pH 7.4, 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, and 0.5% NP-40) supplemented with protease inhibitor and phosphatase inhibitor cocktails, prepared according to the manufacturer's instructions (Roche). The crude extracts were filtered and centrifuged for 15 min at 15,000 *g*. The resulting supernatant (~1.2 ml) was centrifuged at 100,000 *g* for 25 min at 4°C to remove insoluble materials. These mitotic and interphase supernatants, obtained by high-speed centrifugation, were supplemented with 1 mM GTP and 20 μM taxol, and incubated for 20 min at 25°C. The polymerized Mts and MAPs were then recovered by centrifugation for 20 min at 100,000 *g* and 25°C on a glycerol cushion (BRB80: 80 mM Pipes, 1 mM EGTA supplemented with 40% glycerol, 1 mM GTP, and 20 μM taxol). The Mt pellets were washed gently twice with BRB80 and suspended in Laemmli sample buffer supplemented with 5% β-mercaptoethanol.

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

MAPs were resolved by SDS-PAGE in 4–12% XT Bis-Tris polyacrylamide gradient gels (Bio-Rad Laboratories). The gel was stained with SYPRO Ruby gel stain according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories). A Geliance charge-coupled device (CCD)-based imaging system (PerkinElmer) was used for image acquisition.

The lanes on the SDS-PAGE gel corresponding to mitotic and interphase/differentiating embryo extracts were cut into 20 gel slices per lane with a disposable lane picker (Gel Company). Gel slices were deposited in 96-well plates. A liquid handling station (MassPrep; Waters) was used, with sequencing-grade modified trypsin (Promega) according to the manufacturer's instructions, for in-gel protein digestion. Peptide extracts were then dried by evaporation in a SpeedVac (Thermo Fisher Scientific).

LC-MS/MS experiments were performed with an LTQ linear ion trap mass spectrometer connected to a Thermo Surveyor MS pump and equipped with a nanoelectrospray ion source (all from Thermo Fisher Scientific). The peptides were separated in a 10-cm-long PicoFrit BioBasic C18 column with an internal diameter of 0.075 mm (New Objective), with a linear gradient extending from 2 to 50% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) over a period of 30 min, at a flow rate of 200 nL/min. Mass spectra were acquired in the data-dependent acquisition mode (Xcalibur software, version 2.0). Each full-scan mass spectrum (*m/z* 400–2000) was followed by the collision-induced dissociation of the seven ions giving the most intense signals. The dynamic exclusion function was enabled (30 s of exclusion), and the relative collisional fragmentation energy was set at 35%.

All MS/MS spectra were analyzed with Mascot (version 2.4.0; Matrix Science), set up to search against a *Drosophila* UniRef100 protein database (33,950 entries as of November 2012), assuming digestion with trypsin. The fragment and parent ion mass tolerances were 0.5 D and 2.0 D, respectively. The carbamidomethylation of cysteine was specified as a fixed modification, and the oxidation of methionine and phosphorylation on serine, threonine, and tyrosine were specified as variable modifications. Two missed cleavages were allowed.

Scaffold (version 3.6.2; Proteome Software, Inc.) was used to sum spectral counts, to validate MS/MS-based peptide and protein identifications, and to group peptides into proteins. Peptide identifications were accepted if they could be established with a probability >95%, as specified by the Peptide Prophet algorithm (Nesvizhskii et al., 2003), and

contained at least two identified peptides. Protein probabilities were assigned by the Protein Prophet algorithm (Keller et al., 2002). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated on the basis of MS/MS analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Semiquantitative spectral count analysis results obtained with Scaffold provide an estimate of relative protein abundance between conditions. Enrichment ratios were calculated from spectral count information for interphase extracts.

Functional enrichment analysis and network analysis

We used Cytoscape 2.8.3 and BiNGO version 2.44 to identify biological processes overrepresented among the proteins classified into mitotic, general, or interphasic MAPs (Shannon et al., 2003; Maere et al., 2005). We used BiNGO with the GO Slim Generic Gene Ontology Annotation. The significance threshold was set at *P* = 0.05 (hypergeometric test, Benjamini and Hochberg family-wise error rate correction).

Plasmid constructs

All constructs were based on isoform B of Enscn, which has been shown to rescue *ensc* mutants (Sung et al., 2008). All cloning procedures were performed with the Gateway system (Life Technologies) and the clones were checked by sequencing. Full-length Enscn, the N-terminal Mt-binding domain/Enscn homology region 1 domain (MBD/EHR1), and the conserved C-terminal EHR2 domain were amplified by PCR and inserted into the pENTR/TOPO vector (Life Technologies) to create the entry clones from PCR products: full-length Enscn (Ensc-FL), without a STOP codon, with the primers 5'-CACCAATATGGCGAGTCTTGGGGGCCAACAC-3' and 5'-CAGCAGC-GATATATCTTTATTTTCGTGAC-3'; an N-terminal fragment containing the EHR1 domain (Ensc-EHR1), with the primers 5'-CACCAATATGGCGAGTCTTGGGGGCCAACAC-3' and 5'-CGGAGGTTCCCGCTTCGAAGGCGCTTC-3'; and a C-terminal fragment containing the EHR2 fragment (Ensc-EHR2), with the primers 5'-CACCATGCAGGCTCGCCCAAGAAACCATCGC-3' and 5'-CAGCAGCGATATATCTTTATTTTCGTGAC-3'.

Ensc-FL, Ensc-EHR1, and Ensc-EHR2 were also inserted into pET102/TOPO (Life Technologies) to generate hexahistidine (6x-HIS)-tagged constructs. Ensc-EHR1 and Ensc-EHR2 were also recombinated in pMT-DEST48. Ensc-FL-GFP was amplified by PCR with the primers 5'-GCAATGGCGAGTCTTGGGG-3' and 5'-AATCTGTACAGCTCGTCCATGC-3' and inserted directly into pMT/V5-His-TOPO.

Isoform E of EB1 was amplified by PCR with the oligonucleotides 5'-CACCAACATGGCTGTAACGCTACTCC-3' and 5'-ATACTCTCTGCTCTGTGG-3' and inserted into pENTR/TOPO.

The open reading frames encoding EB1 and Enscn were introduced into pUWG with Gateway technology (Invitrogen) to produce the constructs pUWG-EB1 and pUWG-Ensc used for fly transformation, allowing the ubiquitous expression of GFP-tagged proteins.

Fly strains

Flies were maintained under standard conditions at 25°C. Transgenic flies with the following genotypes were used for RNAi: TubGAL80^{ts};69B-GAL4 and 69B-GAL4. Transgenic flies carrying UAS and hairpin sequences were obtained from the Vienna *Drosophila* RNAi Center (Dietzl et al., 2007). Flies expressing the full-length EB1-GFP and full-length Enscn-GFP constructs were used for time-lapse imaging. They were obtained from BestGene Inc. after P-element-mediated transformation with the pUWG-EB1 and pUWG-Ensc vectors. The Enscn-GFP transgene conferred early rescue of the viability of *ensc* mutants. Asterless-YFP (Asl)-expressing flies (Rebollo et al., 2007) were provided by C. Gonzalez (Institute for Research in Biomedicine, Barcelona, Spain). *Khc* mutant flies carrying amino-acid substitutions have been described elsewhere (Djagaeva et al., 2012) and were provided by A. Guichet (Institut Jacques Monod, Paris, France), B. Saxton (University of California, Santa Cruz, Santa Cruz, CA), and A. Ephrussi (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany). A combination of *Khc*²⁷ (null allele) and *Khc*⁶³ (hypomorphic allele) was used in this study. The strains expressing mCherry-α-tubulin and GFP-Sas-4 were provided by R. Basto (Institut Curie, Paris, France) and M. Bettencourt-Dias (Instituto Gulbenkian de Ciencia, Oeiras, Portugal), respectively. The *enscn* mutant fly stocks *enscΔC* (C-terminal deletion), *enscΔN* (N-terminal deletion), and *enscΔnull* (full gene deletion, referred to as *ensc*) were described in the Results and discussion section, obtained by P-element excision, and were provided by P. Rorth (Institute of Molecular and Cell Biology, Singapore; Sung et al., 2008). β-tubulin-GFP flies (Inoue et al., 2004) were provided by M. Savoian and D. Glover (University of Cambridge, Cambridge, England, UK). Jupiter-GFP and the *sas-4*²²¹⁴ mutant (Basto et al., 2006) were obtained from the Bloomington *Drosophila*

Stock Center. With the exception of Jupiter-GFP, which is a trap line with expression under the control of its own promoter (Morin et al., 2001), all GFP and CherryFP fusion proteins were ubiquitously produced under the control of the polyubiquitin promoter.

RNAi in the brain

TUB-GAL80^{ts}; 69B-GAL4 females were crossed with transgenic males carrying UAS-RNAi constructs for the candidate genes. After 6 d at 20°C, the adults were removed and the vials were shifted to 29°C to induce RNAi for 3 d. Brains from five wandering third-instar larvae were then dissected and fixed for immunostaining. In parallel, at least five brains were squashed and stained with 1 µg/ml DAPI for the visualization of chromosome abnormalities (Donaldson et al., 2001).

Production of recombinant proteins and antibody

The vectors pET102-Ensc-FL, pET102-Ensc-EHR1, and pET102-Ensc-EHR2 were transformed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). The production of the Ensc-FL, Ensc-EHR1, and Ensc-EHR2 fragments was induced by incubation with 1 mM IPTG for 4 h at 25°C. 6x-HIS-tagged proteins were purified on Ni-NTA resin (QIAGEN) and dialyzed overnight against PBS at 4°C. The purified Enscins EHR1 and EHR2 domains present in all Enscins isoforms were generally used for the immunization of rabbits for polyclonal antibody production (Eurogentec). For in vitro Mt polymerization assays, Ensc-FL was concentrated on Amicon concentrators (molecular weight cut-off 50 kD) to a final concentration of 30 µM in PBS (EMD Millipore).

Immunofluorescence analysis

S2 cells were plated on concanavalin A-coated coverslips and incubated for 1 h, then fixed by incubation in methanol for 10 min at -20°C. The fixed cells were processed for IF analyses as described previously (Romé et al., 2010). Slides were mounted in ProLong Gold antifading mounting medium (Life Technologies) and observed under an upright DMRXA fluorescence microscope (Leica) equipped with a 63x 1.3 NA objective lens. Images were acquired with a CCD camera (CoolSNAP HQ; Photometrics) and processed with MetaMorph software (Universal Imaging).

For the analysis of spindle morphology in brain Nbs, we found that the following protocol fully preserved the Mt cytoskeleton during mitosis more effectively than the use of the standard PBS-derived fixative. For whole-mount CNS immunostaining, third-instar larval brains were dissected in testis buffer (TB: 183 mM KCl, 47 mM NaCl, 10 mM Tris, and 1 mM EDTA, pH 6.8; Bonaccorsi et al., 2011) and fixed by incubation in TBF (TB supplemented with 10% formaldehyde and 0.01% Triton X-100) for 20 min at 25°C.

Fixed brains were rapidly washed once in PBS and twice in 0.1% Triton X-100 in PBS (PBST) for 10 min each time. The fixed tissue was incubated overnight at 4°C with primary antibodies in PBST supplemented with 1% BSA (PBSTB). The samples were washed twice, for 15 min each time, in PBST, and were then incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies in PBSTB. They were washed twice, for 15 min each time, in PBST, then mounted on slides in ProLong Gold and observed with a SP5 confocal microscope (Leica) equipped with a 63x objective lens (NA 1.40). Images were acquired and processed with ImageJ software.

For the Mt regrowth assay in Nbs, we followed a method previously used to study *misato*, with several modifications (Mottier-Pavie et al., 2011). Brains were dissected in Schneider's medium supplemented with 10% FCS and incubated on ice for 30 min to allow complete Mt depolymerization in a total volume of 50 µl of Schneider's medium. Depending on the genotype analyzed, Mt regrowth was induced at various time points by incubating the samples in a water bath at 25°C. Fixation is triggered by adding 500 µl of TBF and incubating for 20 min at 25°C. Brains were then processed for immunostaining. The experiment was performed at least three times and at least 20 spindles were analyzed for each experiment.

Antibodies and Western blotting

The monoclonal YL1/2 rat anti-detyrosinated tubulin antibody (1:200) and the mouse monoclonal and rabbit polyclonal antiphosphorylated histone H3 (Ser10) antibodies (1:500) were obtained from EMD Millipore. The anti-GFP mouse monoclonal antibody (1:1,000) was obtained from Roche, the rabbit anti-PKCζ (C-20; 1:200) and rabbit anti-actin (1:4,000) polyclonal antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc., the mouse monoclonal anti-V5 antibody was obtained from Life Technologies (1:3,000), and the rabbit polyclonal anti-Khc antibody (1:2,000) was obtained from Cytoskeleton, Inc. The rabbit polyclonal anti-centrosomin antibody (1:1,000) was provided by T. Megraw (Florida State University, Tallahassee, FL; Megraw et al., 2001). The affinity-purified

rabbit anti-Mad2 polyclonal antibody (1:500) was provided by D. Sharp (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY). The rabbit polyclonal anti-Enscins antibody was affinity purified from antigens (EH1 and EH2) immobilized on nitrocellulose membrane and used at a concentration of 1 µg/ml according to a protocol described previously (Montebault et al., 2007). Goat secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:5,000) were obtained from Jackson ImmunoResearch Laboratories, and donkey Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:1,000) were obtained from Life Technologies. For Western blotting, ECL reagent was purchased from Thermo Fisher Scientific.

Live microscopy

Brains expressing the various labeled proteins were dissected in Schneider's *Drosophila* medium containing 10% FCS. Isolated brains were loaded and mounted on stainless steel slides with fat bodies dissected from WT larvae (Siller et al., 2005). The preparations were sealed with mineral oil (Sigma-Aldrich). Images were acquired with a spinning-disk system mounted on an inverted microscope (Eclipse Ti; Nikon) equipped with a 60x 1.4 NA objective lens at 25°C. Z series were acquired every 30 or 60 s with a CCD camera (CoolSNAP HQ²; Photometrics) and a digital camera (sCMOS ORCA Flash 4.0; Hamamatsu Photonics) controlled by MetaMorph acquisition software version X. Images were processed with ImageJ software and are presented as maximum-intensity projections. The mother and daughter centrosomes can be unambiguously distinguished on the basis of their different Mt nucleation potentials after separation, after cytokinesis, or immediately before mitosis (Rebollo et al., 2007).

For Mt end tracking in Nbs, WT and *ensc* mutant brains expressing EB1-GFP were gently squashed in 13.4 µl of fresh Schneider's media (Invitrogen), between a slide and a 22 x 22-mm coverslip, and the excess medium was absorbed with filter paper. The preparation was sealed with mineral halocarbon oil 700 (Sigma-Aldrich) to immobilize it and to prevent cell movement during imaging. Mitotic Nbs were imaged every 0.5 s for 1 min at 25°C, with a 100x 1.4 NA objective lens.

At least 16 mitotic prometaphase Nbs were imaged for comet tracking.

The Mt ends were tracked with the single-particle tracking routine available in Icy image analysis software (Olivo-Marin, 2002; Chenouard et al., 2013). The routine parameters were adjusted for the detection and tracking of most of the Mt ends. Nevertheless, because of the high density of Mts, we observed frequent erroneous merging of tracks corresponding to different Mt ends. These errors were filtered out with a customized Matlab (MathWorks) routine. The crude tracks were first broken at track steps characterized by an instantaneous speed of >0.78 µm/s, probably corresponding to erroneous jumps between different Mt tracks. They were also broken at positions at which a change in track direction of >60° was observed. We retained only the remaining filtered tracks corresponding to at least three time points and we estimated the growing speed for each track by averaging the instantaneous speeds along the track.

Cell culture and transfection

S2 cells were transiently transfected as described previously, and protein production was induced by incubation with 0.3 mM CuSO₄ for 24 h (Romé et al., 2010).

Mt self-assembly and turbidity assays

A 40-µM solution of tubulin purified from porcine brain was prepared in 1 mM GTP in BRB80, and centrifuged for 10 min at 30,000 g, at 4°C, before assembly (Weis et al., 2010). Tubulin polymerization was induced by incubating the samples at 35°C and was monitored turbidimetrically, at 350 nm, with a UVIKON XS spectrophotometer (BioTek Instruments). We evaluated Enscins activity by adding various concentrations of the recombinant protein to tubulin (1.5 and 3 µM). For each experiment, the temperature was shifted to 4°C after 28 min of recording to estimate the degree of protein aggregation after assembly (Weis et al., 2010). Spectrophotometric curves were corrected so as to reflect only Mt polymerization.

Statistical analysis

Differences between datasets were assessed in a nonparametric test (Mann-Whitney-Wilcoxon), with values of P < 0.001 considered significant.

Online supplemental material

Fig. S1 shows the screening strategy used in this study. Fig. S2 demonstrates that the SAC is required for viability and to prevent chromosome segregation defects after *Ensc* RNAi. Fig. S3 shows the specificity of the Enscins antibody and Enscins localization. Table S1 summarizes the phenotypes obtained after RNAi for 18 putative mitotic regulators. Table S2

shows the proteins associated with mitotic and interphase Mt pellets, respectively, and their relative abundance. Table S3 shows the proteins screened in this study. Video 1 shows WT dividing Nbs. Video 2 shows dividing *ensc* mutant Nbs with short spindles. Video 3 shows *ensc* dividing Nbs with centrosome positioning and separation defects. Video 4 shows a WT Nb, expressing labeled centrosomes and Mts, between two consecutive mitoses. Video 5 shows the centrosome separation defects in an *ensc* mutant during interphase and the defective daughter centrosome inheritance. Video 6 shows the centrosomes and the Mts in a WT Nb. Video 7 demonstrates the defective centrosome separation, positioning, and inheritance defect but normal spindle assembly in *khc* mutants. Video 8 shows the Mt dynamics in WT and *ensc* mitotic Nbs. Video 9 shows the short spindle formation in the absence of centrosome and in the absence of both centrosome and *Ensconsin*. Video 10 reveals the *Ensconsin*-GFP fusion protein association with Mts in a dividing Nb and surrounding cells. Supplemental file 1, entitled "trafilt," corresponds to the source code of the routine used to filter the trajectories of the Mt ends obtained from the single particle tracking routine available on the lcy image analysis software. Supplemental file 2, entitled "trafilt_batch," corresponds to the source code of the routine which allows batching the filtering of the Mt end trajectories. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201311094/DC1>.

We would like to thank D. Glover, M. Savoian, C. Gonzalez, T. Megraw, D. Sharp, D. Buster, A. Guichet, W. Saxton, R. Basto, A. Ephrussi, M. Bettencourt-Dias, and P. Rorth for fly stocks and antibodies. We thank M. Savoian, C. Benaud, and S. Giet for critical reading of the manuscript. We thank Drs. A. Royou and E. Montembault for helpful discussions.

This work was funded by the Ligue Nationale Contre le Cancer, l'Association de la Recherche contre le Cancer, Biosit, and the University of Rennes 1. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grants No. MO-178013 to GGP). The authors wish to thank the Proteomics Platform of Quebec Genomic Center for analytical services and the Microscopy Rennes Imaging Center. G.G. Poirier holds a Canada Research Chair in Proteomics. E. Gallaud and R. Coeus are doctoral fellows of the Région Bretagne and the French Ministry of Research, respectively.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 21 November 2013

Accepted: 12 February 2014

References

- Barlan, K., W. Lu, and V.I. Gelfand. 2013. The microtubule-binding protein *ensconsin* is an essential cofactor of kinesin-1. *Curr. Biol.* 23:317–322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.008>
- Basto, R., J. Lau, T. Vinogradova, A. Gardiol, C.G. Woods, A. Khodjakov, and J.W. Raff. 2006. Flies without centrioles. *Cell.* 125:1375–1386. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.025>
- Bonaccorsi, S., M.G. Giansanti, G. Cenci, and M. Gatti. 2011. Preparation of meiotic chromosomes from larval and pupal *Drosophila* testes. *Cold Spring Harb Protoc.* 2011:t5579.
- Bulinski, J.C., and A. Bossler. 1994. Purification and characterization of *ensconsin*, a novel microtubule stabilizing protein. *J. Cell Sci.* 107:2839–2849.
- Cassimeris, L., and J. Morabito. 2004. TOGp, the human homolog of XMAP215/Dis1, is required for centrosome integrity, spindle pole organization, and bipolar spindle assembly. *Mol. Biol. Cell.* 15:1580–1590. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E03-07-0544>
- Causinus, E., and C. Gonzalez. 2005. Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 37:1125–1129. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1632>
- Chenouard, N., I. Bloch, and J.C. Olivo-Marin. 2013. Multiple hypothesis tracking for cluttered biological image sequences. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* 35:2736–3750. <http://dx.doi.org/10.1109/TPAMI.2013.97>
- Conduit, P.T., and J.W. Raff. 2010. Cnn dynamics drive centrosome size asymmetry to ensure daughter centriole retention in *Drosophila* neuroblasts. *Curr. Biol.* 20:2187–2192. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2010.11.055>
- Cullen, C.F., P. Deák, D.M. Glover, and H. Ohkura. 1999. mini spindles: A gene encoding a conserved microtubule-associated protein required for the integrity of the mitotic spindle in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 146:1005–1018. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.146.5.1005>
- Dietzl, G., D. Chen, F. Schnorrrer, K.C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oettel, S. Scheiblaue, et al. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature.* 448:151–156. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05954>
- Djagaeva, I., D.J. Rose, A. Lim, C.E. Venter, K.M. Brendza, P. Moua, and W.M. Saxton. 2012. Three routes to suppression of the neurodegenerative phenotypes caused by kinesin heavy chain mutations. *Genetics.* 192:173–183. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.112.140798>
- Donaldson, M.M., A.A. Tavares, H. Ohkura, P. Deak, and D.M. Glover. 2001. Metaphase arrest with centrosome separation in polo mutants of *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 153:663–676. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.153.4.663>
- Gadde, S., and R. Heald. 2004. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr. Biol.* 14:R797–R805. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.021>
- Gaetz, J., and T.M. Kapoor. 2004. Dynein/dynactin regulate metaphase spindle length by targeting depolymerizing activities to spindle poles. *J. Cell Biol.* 166:465–471. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200404015>
- Gaskin, F. 2011. Analysis of microtubule assembly kinetics using turbidimetry. *Methods Mol. Biol.* 777:99–105. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-61779-252-6_7
- Goodwin, S.S., and R.D. Vale. 2010. Patronin regulates the microtubule network by protecting microtubule minus ends. *Cell.* 143:263–274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.022>
- Goshima, G., R. Wollman, N. Stuurman, J.M. Scholey, and R.D. Vale. 2005. Length control of the metaphase spindle. *Curr. Biol.* 15:1979–1988. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.054>
- Inoue, Y.H., M.S. Savoian, T. Suzuki, E. Mátthé, M.T. Yamamoto, and D.M. Glover. 2004. Mutations in orbit/mast reveal that the central spindle is comprised of two microtubule populations, those that initiate cleavage and those that propagate furrow ingression. *J. Cell Biol.* 166:49–60. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200402052>
- Januschke, J., and C. Gonzalez. 2010. The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in *Drosophila* neuroblasts. *J. Cell Biol.* 188:693–706. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200905024>
- Januschke, J., S. Llamazares, J. Reina, and C. Gonzalez. 2011. *Drosophila* neuroblasts retain the daughter centrosome. *Nat Commun.* 2:243. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1245>
- Keller, A., A.I. Nesvizhskii, E. Kolker, and R. Aebersold. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.* 74:5383–5392. <http://dx.doi.org/10.1021/ac025747h>
- Laycock, J.E., M.S. Savoian, and D.M. Glover. 2006. Antagonistic activities of Klp10A and Orbit regulate spindle length, bipolarity and function in vivo. *J. Cell Sci.* 119:2354–2361. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.02957>
- Maere, S., K. Heymans, and M. Kuiper. 2005. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics.* 21:3448–3449. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti551>
- Maiato, H., C.L. Rieder, and A. Khodjakov. 2004. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J. Cell Biol.* 167:831–840. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200407090>
- Maiato, H., A. Khodjakov, and C.L. Rieder. 2005. *Drosophila* CLASP is required for the incorporation of microtubule subunits into fluxing kinetochore fibres. *Nat. Cell Biol.* 7:42–47. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1207>
- Megraw, T.L., L.R. Kao, and T.C. Kaufman. 2001. Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Curr. Biol.* 11:116–120. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00017-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00017-3)
- Metzger, T., V. Gache, M. Xu, B. Cadot, E.S. Folker, B.E. Richardson, E.R. Gomes, and M.K. Baylies. 2012. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature.* 484:120–124. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10914>
- Montembault, E., S. Dutertre, C. Prigent, and R. Giet. 2007. PRP4 is a spindle assembly checkpoint protein required for MPS1, MAD1, and MAD2 localization to the kinetochores. *J. Cell Biol.* 179:601–609. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200703133>
- Morin, X., R. Daneman, M. Zavortink, and W. Chia. 2001. A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:15050–15055. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.261408198>
- Mottier-Pavie, V., G. Cenci, F. Verni, M. Gatti, and S. Bonaccorsi. 2011. Phenotypic analysis of misato function reveals roles of noncentrosomal microtubules in *Drosophila* spindle formation. *J. Cell Sci.* 124:706–717. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.072348>
- Mummery-Widmer, J.L., M. Yamazaki, T. Stoeger, M. Novatchkova, S. Bhalerao, D. Chen, G. Dietzl, B.J. Dickson, and J.A. Knoblich. 2009. Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi. *Nature.* 458:987–992. <http://dx.doi.org/10.1038/nature07936>
- Nesvizhskii, A.I., A. Keller, E. Kolker, and R. Aebersold. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 75:4646–4658. <http://dx.doi.org/10.1021/ac0341261>

- Neumüller, R.A., and J.A. Knoblich. 2009. Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev.* 23:2675–2699. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1850809>
- Neumüller, R.A., C. Richter, A. Fischer, M. Novatchkova, K.G. Neumüller, and J.A. Knoblich. 2011. Genome-wide analysis of self-renewal in *Drosophila* neural stem cells by transgenic RNAi. *Cell Stem Cell.* 8:580–593. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.022>
- Olivio-Marin, J.C. 2002. Extraction of spots in biological images using multi-scale products. *Pattern Recognit.* 35:1989–1996. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-3203\(01\)00127-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-3203(01)00127-3)
- Rebollo, E., P. Sampaio, J. Januschke, S. Llamazares, H. Varmark, and C. González. 2007. Functionally unequal centrosomes drive spindle orientation in asymmetrically dividing *Drosophila* neural stem cells. *Dev. Cell.* 12:467–474. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2007.01.021>
- Romé, P., E. Montembault, N. Franck, A. Pascal, D.M. Glover, and R. Giet. 2010. Aurora A contributes to p150(glued) phosphorylation and function during mitosis. *J. Cell Biol.* 189:651–659. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201001144>
- Rusan, N.M., and M. Peifer. 2007. A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J. Cell Biol.* 177:13–20. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200612140>
- Sawin, K.E., K. LeGuellec, M. Philippe, and T.J. Mitchison. 1992. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature.* 359:540–543. <http://dx.doi.org/10.1038/359540a0>
- Shannon, P., A. Markiel, O. Ozier, N.S. Baliga, J.T. Wang, D. Ramage, N. Amin, B. Schwikowski, and T. Ideker. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13:2498–2504. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.1239303>
- Siller, K.H., M. Serr, R. Steward, T.S. Hays, and C.Q. Doe. 2005. Live imaging of *Drosophila* brain neuroblasts reveals a role for Lis1/dynactin in spindle assembly and mitotic checkpoint control. *Mol. Biol. Cell.* 16:5127–5140. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E05-04-0338>
- Sung, H.H., I.A. Telley, P. Papadaki, A. Ephrussi, T. Surrey, and P. Rørth. 2008. *Drosophila* ensconsin promotes productive recruitment of Kinesin-1 to microtubules. *Dev. Cell.* 15:866–876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2008.10.006>
- Tanenbaum, M.E., and R.H. Medema. 2010. Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly. *Dev. Cell.* 19:797–806. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2010.11.011>
- Tournebize, R., A. Popov, K. Kinoshita, A.J. Ashford, S. Rybina, A. Pozniakovsky, T.U. Mayer, C.E. Walczak, E. Karsenti, and A.A. Hyman. 2000. Control of microtubule dynamics by the antagonistic activities of XMAP215 and XKCM1 in *Xenopus* egg extracts. *Nat. Cell Biol.* 2:13–19.
- Walczak, C.E., and R. Heald. 2008. Mechanisms of mitotic spindle assembly and function. *Int. Rev. Cytol.* 265:111–158. [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)65003-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(07)65003-7)
- Weis, F., L. Moullintraffort, C. Heichette, D. Chrétien, and C. Garnier. 2010. The 90-kDa heat shock protein Hsp90 protects tubulin against thermal denaturation. *J. Biol. Chem.* 285:9525–9534. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.096586>
- Wittmann, T., H. Boleti, C. Antony, E. Karsenti, and I. Vernos. 1998. Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein. *J. Cell Biol.* 143:673–685. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.143.3.673>
- Wodarz, A., and I. Näthke. 2007. Cell polarity in development and cancer. *Nat. Cell Biol.* 9:1016–1024. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb433>

Références bibliographiques

- Abe, Y., Ohsugi, M., Haraguchi, K., Fujimoto, J., and Yamamoto, T. (2006). LATS2–Ajuba complex regulates γ -tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. *FEBS Lett.* *580*, 782–788.
- Abrieu, A., Kahana, J.A., Wood, K.W., and Cleveland, D.W. (2000). CENP-E as an Essential Component of the Mitotic Checkpoint In Vitro. *Cell* *102*, 817–826.
- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J.A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D.W., and Labbé, J.-C. (2001). Mps1 Is a Kinetochore-Associated Kinase Essential for the Vertebrate Mitotic Checkpoint. *Cell* *106*, 83–93.
- Ahonen, L.J., Kallio, M.J., Daum, J.R., Bolton, M., Manke, I.A., Yaffe, M.B., Stukenberg, P.T., and Gorbsky, G.J. (2005). Polo-like Kinase 1 Creates the Tension-Sensing 3F3/2 Phosphoepitope and Modulates the Association of Spindle-Checkpoint Proteins at Kinetochores. *Curr. Biol.* *15*, 1078–1089.
- Albee, A.J., Tao, W., and Wiese, C. (2006). Phosphorylation of Maskin by Aurora-A Is Regulated by RanGTP and Importin β . *J. Biol. Chem.* *281*, 38293–38301.
- Alexander, J., Lim, D., Joughin, B.A., Hegemann, B., Hutchins, J.R.A., Ehrenberger, T., Ivins, F., Sessa, F., Hudecz, O., Nigg, E.A., et al. (2011). Spatial Exclusivity Combined with Positive and Negative Selection of Phosphorylation Motifs Is the Basis for Context-Dependent Mitotic Signaling. *Sci Signal* *4*, ra42–ra42.
- Anand, S., Penrhyn-Lowe, S., and Venkitaraman, A.R. (2003). AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. *Cancer Cell* *3*, 51–62.
- Andrésson, T., and Ruderman, J.V. (1998). The kinase Eg2 is a component of the *Xenopus* oocyte progesterone-activated signaling pathway. *EMBO J.* *17*, 5627–5637.
- Aravamudhan, P., Goldfarb, A.A., and Joglekar, A.P. (2015). The kinetochore encodes a mechanical switch to disrupt spindle assembly checkpoint signalling. *Nat. Cell Biol.* *17*, 868–879.
- Arlot-Bonnemains, Y., Klotzbucher, A., Giet, R., Uzbekov, R., Bihan, R., and Prigent, C. (2001). Identification of a functional destruction box in the *Xenopus laevis* aurora-A kinase pEg2. *FEBS Lett.* *508*, 149–152.
- Arnaud, L., Pines, J., and Nigg, E.A. (1998). GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes. *Chromosoma* *107*, 424–429.
- Atwood, S.X., and Prehoda, K.E. (2009). aPKC Phosphorylates Miranda to Polarize Fate Determinants during Neuroblast Asymmetric Cell Division. *Curr. Biol.* *19*, 723–729.
- Baba, Y., Noshu, K., Shima, K., Irahara, N., Kure, S., Toyoda, S., Kirkner, G.J., Goel, A., Fuchs, C.S., and Ogino, S. (2009). Aurora-A Expression Is Independently Associated with Chromosomal Instability in Colorectal Cancer. *Neoplasia* *N. Y. N* *11*, 418–425.
- Bai, M., Ni, J., Wu, J., Wang, B., Shen, S., and Yu, L. (2014). A novel mechanism for activation of Aurora-A kinase by Ajuba. *Gene* *543*, 133–139.
- Baker, D.J., Jeganathan, K.B., Cameron, J.D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R.B., de Groen, P.C., Roche, P., et al. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat. Genet.* *36*, 744–749.
- Baker, D.J., Jin, F., Jeganathan, K.B., and van Deursen, J.M. (2009). Whole Chromosome Instability Caused by Bub1 Insufficiency Drives Tumorigenesis through Tumor Suppressor Gene Loss of Heterozygosity. *Cancer Cell* *16*, 475–486.
- Ballister, E.R., Riegman, M., and Lampson, M.A. (2014). Recruitment of Mad1 to metaphase kinetochores is sufficient to reactivate the mitotic checkpoint. *J. Cell Biol.* *204*, 901–908.
- Barr, A.R., and Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J. Cell Sci.* *120*, 2987–2996.
- Barros, T.P., Kinoshita, K., Hyman, A.A., and Raff, J.W. (2005). Aurora A activates D-TACC–Mps complexes exclusively at centrosomes to stabilize centrosomal microtubules. *J. Cell Biol.* *170*, 1039–1046.
- Basto, R., Scaerou, F., Mische, S., Wojcik, E., Lefebvre, C., Gomes, R., Hays, T., and Karess, R. (2004). In Vivo Dynamics of the Rough Deal Checkpoint Protein during *Drosophila* Mitosis. *Curr. Biol.* *14*, 56–61.
- Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C.G., Khodjakov, A., and Raff, J.W. (2006). Flies without Centrioles. *Cell* *125*, 1375–1386.
- Basu, J., Bousbaa, H., Logarinho, E., Li, Z., Williams, B.C., Lopes, C., Sunkel, C.E., and Goldberg, M.L. (1999).

- Mutations in the Essential Spindle Checkpoint Gene *bub1* Cause Chromosome Missegregation and Fail to Block Apoptosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* *146*, 13–28.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I., and Conti, E. (2003). Structural Basis of Aurora-A Activation by TPX2 at the Mitotic Spindle. *Mol. Cell* *12*, 851–862.
- Bell, G.P., Fletcher, G.C., Brain, R., and Thompson, B.J. (2015). Aurora Kinases Phosphorylate Lgl to Induce Mitotic Spindle Orientation in *Drosophila* Epithelia. *Curr. Biol.* *25*, 61–68.
- Bello, B., Reichert, H., and Hirth, F. (2006). The brain tumor gene negatively regulates neural progenitor cell proliferation in the larval central brain of *Drosophila*. *Development* *133*, 2639–2648.
- Bello, B.C., Izergina, N., Caussinus, E., and Reichert, H. (2008). Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. *Neural Develop.* *3*, 5.
- Berdnik, D., and Knoblich, J.A. (2002). *Drosophila* Aurora-A Is Required for Centrosome Maturation and Actin-Dependent Asymmetric Protein Localization during Mitosis. *Curr. Biol.* *12*, 640–647.
- Berdnik, D., Török, T., González-Gaitán, M., and Knoblich, J.A. (2002). The Endocytic Protein α -Adaptin Is Required for Numb-Mediated Asymmetric Cell Division in *Drosophila*. *Dev. Cell* *3*, 221–231.
- Berger, C., Harzer, H., Burkard, T.R., Steinmann, J., van der Horst, S., Laurenson, A.-S., Novatchkova, M., Reichert, H., and Knoblich, J.A. (2012). FACS Purification and Transcriptome Analysis of *Drosophila* Neural Stem Cells Reveals a Role for Klumpfuss in Self-Renewal. *Cell Rep.* *2*, 407–418.
- Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J.A. (2006). Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in *Drosophila* Neural Stem Cells. *Cell* *124*, 1241–1253.
- Biggins, S., and Murray, A.W. (2001). The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev.* *15*, 3118–3129.
- Bird, A.W., and Hyman, A.A. (2008). Building a spindle of the correct length in human cells requires the interaction between TPX2 and Aurora A. *J. Cell Biol.* *182*, 289–300.
- Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., et al. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J.* *17*, 3052–3065.
- Bivik, C., MacDonald, R.B., Gunnar, E., Mazouni, K., Schweisguth, F., and Thor, S. (2016). Control of Neural Daughter Cell Proliferation by Multi-level Notch/Su(H)/E(spl)-HLH Signaling. *PLOS Genet* *12*, e1005984.
- Boone, J.Q., and Doe, C.Q. (2008). Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev. Neurobiol.* *68*, 1185–1195.
- Boveri, T. (2008). Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J. Cell Sci.* *121*, 1–84.
- Bowman, S.K., Neumüller, R.A., Novatchkova, M., Du, Q., and Knoblich, J.A. (2006). The *Drosophila* NuMA Homolog Mud Regulates Spindle Orientation in Asymmetric Cell Division. *Dev. Cell* *10*, 731–742.
- Bowman, S.K., Rolland, V., Betschinger, J., Kinsey, K.A., Emery, G., and Knoblich, J.A. (2008). The Tumor Suppressors Brat and Numb Regulate Transit-Amplifying Neuroblast Lineages in *Drosophila*. *Dev. Cell* *14*, 535–546.
- Brady, D.M., and Hardwick, K.G. (2000). Complex formation between Mad1p, Bub1p and Bub3p is crucial for spindle checkpoint function. *Curr. Biol.* *10*, 675–678.
- Braunstein, I., Miniowitz, S., Moshe, Y., and Hershko, A. (2007). Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 4870–4875.
- Briassouli, P., Chan, F., Savage, K., Reis-Filho, J.S., and Linardopoulos, S. (2007). Aurora-A Regulation of Nuclear Factor- κ B Signaling by Phosphorylation of I κ B α . *Cancer Res.* *67*, 1689–1695.
- Brodie, K.M., and Henderson, B.R. (2012). Characterization of BRCA1 Protein Targeting, Dynamics, and Function at the Centrosome A ROLE FOR THE NUCLEAR EXPORT SIGNAL, CRM1, AND AURORA A KINASE. *J. Biol. Chem.* *287*, 7701–7716.
- Bruinsma, W., Macûrek, L., Freire, R., Lindqvist, A., and Medema, R.H. (2014). Bora and Aurora-A continue to activate Plk1 in mitosis. *J Cell Sci* *127*, 801–811.
- Buffin, E., Lefebvre, C., Huang, J., Gagou, M.E., and Karess, R.E. (2005). Recruitment of Mad2 to the Kinetochores

- Requires the Rod/Zw10 Complex. *Curr. Biol.* *15*, 856–861.
- Buffin, E., Emre, D., and Karess, R.E. (2007). Flies without a spindle checkpoint. *Nat. Cell Biol.* *9*, 565–572.
- Burgess, S.G., Peset, I., Joseph, N., Cavazza, T., Vernos, I., Pfuhl, M., Gergely, F., and Bayliss, R. (2015). Aurora-A-Dependent Control of TACC3 Influences the Rate of Mitotic Spindle Assembly. *PLOS Genet* *11*, e1005345.
- Burton, J.L., and Solomon, M.J. (2007). Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APCCdc20 in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev.* *21*, 655–667.
- Cabernard, C., and Doe, C.Q. (2009). Apical/Basal Spindle Orientation Is Required for Neuroblast Homeostasis and Neuronal Differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell* *17*, 134–141.
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K.V., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* *392*, 300–303.
- Cahu, J., Olichon, A., Hentrich, C., Schek, H., Drinjakovic, J., Zhang, C., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G., and Surrey, T. (2008). Phosphorylation by Cdk1 Increases the Binding of Eg5 to Microtubules In Vitro and in *Xenopus* Egg Extract Spindles. *PLOS ONE* *3*, e3936.
- Caldas, G.V., Lynch, T.R., Anderson, R., Afreen, S., Varma, D., and DeLuca, J.G. (2015). The RZZ complex requires the N-terminus of KNL1 to mediate optimal Mad1 kinetochore localization in human cells. *Open Biol.* *5*, 150160.
- Campbell, M.S., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Mitotic checkpoint proteins HsMAD1 and HsMAD2 are associated with nuclear pore complexes in interphase. *J. Cell Sci.* *114*, 953–963.
- Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2003). The cellular geography of Aurora kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *4*, 842–854.
- Carvalho, S., Ribeiro, S.A., Arocena, M., Kasciukovic, T., Temme, A., Koehler, K., Huebner, A., and Griffiths, E.R. (2015). The nucleoporin ALADIN regulates Aurora A localization to ensure robust mitotic spindle formation. *Mol. Biol. Cell* *26*, 3424–3438.
- Carvalho, C.A., Moreira, S., Ventura, G., Sunkel, C.E., and Morais-de-Sá, E. (2015). Aurora A Triggers Lgl Cortical Release during Symmetric Division to Control Planar Spindle Orientation. *Curr. Biol.* *25*, 53–60.
- Castellanos, E., Dominguez, P., and Gonzalez, C. (2008). Centrosome Dysfunction in *Drosophila* Neural Stem Cells Causes Tumors that Are Not Due to Genome Instability. *Curr. Biol.* *18*, 1209–1214.
- Castro, A., Vigneron, S., Bernis, C., Labbé, J.-C., Prigent, C., and Lorca, T. (2002a). The D-Box-activating domain (DAD) is a new proteolysis signal that stimulates the silent D-Box sequence of Aurora-A. *EMBO Rep.* *3*, 1209–1214.
- Castro, A., Arlot-Bonnemains, Y., Vigneron, S., Labbé, J.-C., Prigent, C., and Lorca, T. (2002b). APC/Fizzy-Related targets Aurora-A kinase for proteolysis. *EMBO Rep.* *3*, 457–462.
- Caussinus, E., and Gonzalez, C. (2005). Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* *37*, 1125–1129.
- Cazales, M., Schmitt, E., Montembault, E., Dozier, C., Prigent, C., and Ducommun, B. (2005). CDC25B Phosphorylation by Aurora A Occurs at the G2/M Transition and is Inhibited by DNA Damage. *Cell Cycle* *4*, 1233–1238.
- Chabu, C., and Doe, C.Q. (2009). Twins/PP2A regulates aPKC to control neuroblast cell polarity and self-renewal. *Dev. Biol.* *330*, 399–405.
- Chan, C., and Botstein, D. (1993). Isolation and Characterization of Chromosome-Gain and Increase-in-Ploidy Mutants in Yeast. *Genetics* *135*, 677–691.
- Chan, E.H.Y., Santamaria, A., Silljé, H.H.W., and Nigg, E.A. (2008). Plk1 regulates mitotic Aurora A function through β TrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma* *117*, 457–469.
- Chan, G.K.T., Jablonski, S.A., Sudakin, V., Hittle, J.C., and Yen, T.J. (1999). Human Bubr1 Is a Mitotic Checkpoint Kinase That Monitors Cenp-E Functions at Kinetochores and Binds the Cyclosome/APC. *J. Cell Biol.* *146*, 941–954.
- Chao, W.C.H., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E.H., and Barford, D. (2012). Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* *484*, 208–213.
- Charles, J.F., Jaspersen, S.L., Tinker-Kulberg, R.L., Hwang, L., Szidon, A., and Morgan, D.O. (1998). The Polo-

- related kinase Cdc5 activates and is destroyed by the mitotic cyclin destruction machinery in *S. cerevisiae*. *Curr. Biol.* *8*, 497–507.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., and Desai, A. (2006). The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochores. *Cell* *127*, 983–997.
- Cheeseman, L.P., Booth, D.G., Hood, F.E., Prior, I.A., and Royle, S.J. (2011). Aurora A kinase activity is required for localization of TACC3/ch-TOG/clathrin inter-microtubule bridges. *Commun. Integr. Biol.* *4*, 409–412.
- Chen, J.-F., Zhang, Y., Wilde, J., Hansen, K.C., Lai, F., and Niswander, L. (2014). Microcephaly disease gene *Wdr62* regulates mitotic progression of embryonic neural stem cells and brain size. *Nat. Commun.* *5*, 3885.
- Chen, K., Koe, C.T., Xing, Z.B., Tian, X., Rossi, F., Wang, C., Tang, Q., Zong, W., Hong, W.J., Taneja, R., et al. (2016). *Arl2*- and *Msp*s-dependent microtubule growth governs asymmetric division. *J. Cell Biol.* *212*, 661–676.
- Chen, R.-H., Shevchenko, A., Mann, M., and Murray, A.W. (1998). Spindle Checkpoint Protein *Xmad1* Recruits *Xmad2* to Unattached Kinetochores. *J. Cell Biol.* *143*, 283–295.
- Chen, S.-S., Chang, P.-C., Cheng, Y.-W., Tang, F.-M., and Lin, Y.-S. (2002). Suppression of the *STK15* oncogenic activity requires a transactivation-independent *p53* function. *EMBO J.* *21*, 4491–4499.
- Chi, Y.-H., Haller, K., Ward, M.D., Semmes, O.J., Li, Y., and Jeang, K.-T. (2008). Requirements for Protein Phosphorylation and the Kinase Activity of Polo-like Kinase 1 (*Plk1*) for the Kinetochores Function of Mitotic Arrest Deficiency Protein 1 (*Mad1*). *J. Biol. Chem.* *283*, 35834–35844.
- Chiu, S.-C., Chen, J.-M.M., Wei, T.-Y.W., Cheng, T.-S., Wang, Y.-H.C., Ku, C.-F., Lian, C.-H., Liu, C.-C.J., Kuo, Y.-C., and Yu, C.-T.R. (2014). The mitosis-regulating and protein-protein interaction activities of Astrin are controlled by Aurora-A-induced phosphorylation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *307*, C466–C478.
- Chmátal, L., Yang, K., Schultz, R.M., and Lampson, M.A. (2015). Spatial Regulation of Kinetochores Microtubule Attachments by Destabilization at Spindle Poles in Meiosis I. *Curr. Biol.* *25*, 1835–1841.
- Choksi, S.P., Southall, T.D., Bossing, T., Edoff, K., de Wit, E., Fischer, B.E., van Steensel, B., Micklem, G., and Brand, A.H. (2006). Prospero Acts as a Binary Switch between Self-Renewal and Differentiation in *Drosophila* Neural Stem Cells. *Dev. Cell* *11*, 775–789.
- Chou, C.-H., Loh, J.-K., Yang, M.-C., Lin, C.-C., Hong, M.-C., Cho, C.-L., Chou, A.-K., Wang, C.-H., Lieu, A.-S., Howng, S.-L., et al. (2015). AIBp regulates mitotic entry and mitotic spindle assembly by controlling activation of both Aurora-A and *Plk1*. *Cell Cycle* *14*, 2764–2776.
- Chou, E.-J., Hung, L.-Y., Tang, C.-J.C., Hsu, W.-B., Wu, H.-Y., Liao, P.-C., and Tang, T.K. (2016). Phosphorylation of CPAP by Aurora-A Maintains Spindle Pole Integrity during Mitosis. *Cell Rep.* *14*, 2975–2987.
- Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degrossi, F., and Salmon, E.D. (2001). Merotelic Kinetochores Orientation Is a Major Mechanism of Aneuploidy in Mitotic Mammalian Tissue Cells. *J. Cell Biol.* *153*, 517–528.
- Collin, P., Nashchekina, O., Walker, R., and Pines, J. (2013). The spindle assembly checkpoint works like a rheostat rather than a toggle switch. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1378–1385.
- Conde, C., Osswald, M., Barbosa, J., Moutinho-Santos, T., Pinheiro, D., Guimarães, S., Matos, I., Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2013). *Drosophila* Polo regulates the spindle assembly checkpoint through *Mps1*-dependent *BubR1* phosphorylation. *EMBO J.* *32*, 1761–1777.
- Conduit, P.T., and Raff, J.W. (2010). Cnn Dynamics Drive Centrosome Size Asymmetry to Ensure Daughter Centriole Retention in *Drosophila* Neuroblasts. *Curr. Biol.* *20*, 2187–2192.
- Coon, T.A., Glasser, J.R., Mallampalli, R.K., and Chen, B.B. (2012). Novel E3 ligase component *FBXL7* ubiquitinates and degrades Aurora A, causing mitotic arrest. *Cell Cycle* *11*, 721–729.
- Crane, R., Kloepfer, A., and Ruderman, J.V. (2004). Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J. Cell Sci.* *117*, 5975–5983.
- Craney, A., Kelly, A., Jia, L., Fedrigo, I., Yu, H., and Rape, M. (2016). Control of APC/C-dependent ubiquitin chain elongation by reversible phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 1540–1545.
- D’Assoro, A.B., Haddad, T., and Galanis, E. (2016). Aurora-A Kinase as a Promising Therapeutic Target in Cancer. *Front. Oncol.* *5*.

- Davenport, J., Harris, L.D., and Goorha, R. (2006). Spindle checkpoint function requires Mad2-dependent Cdc20 binding to the Mad3 homology domain of BubR1. *Exp. Cell Res.* *312*, 1831–1842.
- De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2005). The Mad1/Mad2 Complex as a Template for Mad2 Activation in the Spindle Assembly Checkpoint. *Curr. Biol.* *15*, 214–225.
- De Luca, M., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2006). A functional interplay between Aurora-A, Plk1 and TPX2 at spindle poles: Plk1 controls centrosomal localization of Aurora-A and TPX2 spindle association. *Cell Cycle Georget. Tex* *5*, 296–303.
- De Luca, M., Brunetto, L., Asteriti, I.A., Giubettini, M., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2008). Aurora-A and ch-TOG act in a common pathway in control of spindle pole integrity. *Oncogene* *27*, 6539–6549.
- Deák, P., Donaldson, M., and Glover, D.M. (2003). Mutations in *mákos*, a *Drosophila* gene encoding the Cdc27 subunit of the anaphase promoting complex, enhance centrosomal defects in *polo* and are suppressed by mutations in *twins/aar*, which encodes a regulatory subunit of PP2A. *J. Cell Sci.* *116*, 4147–4158.
- Dekanty, A., and Milán, M. (2013). Aneuploidy, cell delamination and tumorigenesis in *Drosophila* epithelia. *Cell Cycle* *12*, 728–731.
- Dekanty, A., Barrio, L., Muzzopappa, M., Auer, H., and Milán, M. (2012). Aneuploidy-induced delaminating cells drive tumorigenesis in *Drosophila* epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 20549–20554.
- Derive, N., Landmann, C., Montebault, E., Claverie, M.-C., Pierre-Elies, P., Goutte-Gattat, D., Founounou, N., McCusker, D., and Royou, A. (2015). Bub3–BubR1-dependent sequestration of Cdc20Fizzy at DNA breaks facilitates the correct segregation of broken chromosomes. *J. Cell Biol.* *211*, 517–532.
- Descombes, P., and Nigg, E.A. (1998). The polo-like kinase Plx1 is required for M phase exit and destruction of mitotic regulators in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J.* *17*, 1328–1335.
- Diaz-Martinez, L.A., Tian, W., Li, B., Warrington, R., Jia, L., Brautigam, C.A., Luo, X., and Yu, H. (2015). The Cdc20-binding Phe Box of the Spindle Checkpoint Protein BubR1 Maintains the Mitotic Checkpoint Complex During Mitosis. *J. Biol. Chem.* *290*, 2431–2443.
- Dick, A.E., and Gerlich, D.W. (2013). Kinetic framework of spindle assembly checkpoint signalling. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1370–1377.
- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S.S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* *161*, 267–280.
- Dobles, M., Liberal, V., Scott, M.L., Benezra, R., and Sorger, P.K. (2000). Chromosome Missegregation and Apoptosis in Mice Lacking the Mitotic Checkpoint Protein Mad2. *Cell* *101*, 635–645.
- Dodson, C.A., and Bayliss, R. (2012). Activation of Aurora-A Kinase by Protein Partner Binding and Phosphorylation Are Independent and Synergistic. *J. Biol. Chem.* *287*, 1150–1157.
- Dodson, C.A., Yeoh, S., Haq, T., and Bayliss, R. (2013). A Kinetic Test Characterizes Kinase Intramolecular and Intermolecular Autophosphorylation Mechanisms. *Sci Signal* *6*, ra54-ra54.
- Dominguez-Brauer, C., Thu, K.L., Mason, J.M., Blaser, H., Bray, M.R., and Mak, T.W. (2015). Targeting Mitosis in Cancer: Emerging Strategies. *Mol. Cell* *60*, 524–536.
- Du, J., Jablonski, S., Yen, T.J., and Hannon, G.J. (2008). Astrin regulates Aurora-A localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *370*, 213–219.
- Duijf, P.H.G., and Benezra, R. (2013). The cancer biology of whole-chromosome instability. *Oncogene* *32*, 4727–4736.
- Duijf, P.H.G., Schultz, N., and Benezra, R. (2013). Cancer cells preferentially lose small chromosomes. *Int. J. Cancer* *132*, 2316–2326.
- Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouché, J.-P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., et al. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2–M transition. *J. Cell Sci.* *117*, 2523–2531.
- Eckerdt, F., Pascreau, G., Phistry, M., Lewellyn, A.L., DePaoli-Roach, A.A., and Maller, J.L. (2009). Phosphorylation of TPX2 by Plx1 enhances activation of Aurora A. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 2413–2419.

- Elowe, S., Hümmer, S., Uldschmid, A., Li, X., and Nigg, E.A. (2007). Tension-sensitive Plk1 phosphorylation on BubR1 regulates the stability of kinetochore–microtubule interactions. *Genes Dev.* *21*, 2205–2219.
- Elowe, S., Dulla, K., Uldschmid, A., Li, X., Dou, Z., and Nigg, E.A. (2010). Uncoupling of the spindle-checkpoint and chromosome-congression functions of BubR1. *J Cell Sci* *123*, 84–94.
- Emre, D., Terracol, R., Poncet, A., Rahmani, Z., and Karsenti, R.E. (2011). A mitotic role for Mad1 beyond the spindle checkpoint. *J Cell Sci* *124*, 1664–1671.
- Eroglu, E., Burkard, T.R., Jiang, Y., Saini, N., Homem, C.C.F., Reichert, H., and Knoblich, J.A. (2014). SWI/SNF Complex Prevents Lineage Reversion and Induces Temporal Patterning in Neural Stem Cells. *Cell* *156*, 1259–1273.
- Espert, A., Uluocak, P., Bastos, R.N., Mangat, D., Graab, P., and Gruneberg, U. (2014). PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J. Cell Biol.* *206*, 833–842.
- Etemad, B., Kuijt, T.E.F., and Kops, G.J.P.L. (2015). Kinetochore-microtubule attachment is sufficient to satisfy the human spindle assembly checkpoint. *Nat. Commun.* *6*, 8987.
- Eyers, P.A., and Maller, J.L. (2004). Regulation of Xenopus Aurora A Activation by TPX2. *J. Biol. Chem.* *279*, 9008–9015.
- Eyers, P.A., Erikson, E., Chen, L.G., and Maller, J.L. (2003). A Novel Mechanism for Activation of the Protein Kinase Aurora A. *Curr. Biol.* *13*, 691–697.
- Eytan, E., Wang, K., Miniowitz-Shemtov, S., Sitry-Shevah, D., Kaisari, S., Yen, T.J., Liu, S.-T., and Hershko, A. (2014). Disassembly of mitotic checkpoint complexes by the joint action of the AAA-ATPase TRIP13 and p31comet. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 12019–12024.
- Fang, G. (2002). Checkpoint Protein BubR1 Acts Synergistically with Mad2 to Inhibit Anaphase-promoting Complex. *Mol. Biol. Cell* *13*, 755–766.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* *12*, 1871–1883.
- Farruggio, D.C., Townsley, F.M., and Ruderman, J.V. (1999). Cdc20 associates with the kinase aurora2/Aik. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7306–7311.
- Fava, L.L., Kaulich, M., Nigg, E.A., and Santamaria, A. (2011). Probing the in vivo function of Mad1:C-Mad2 in the spindle assembly checkpoint: Mad1:C-Mad2 controls SAC and mitotic timing. *EMBO J.* *30*, 3322–3336.
- Ferrari, S., Marin, O., Pagano, M.A., Meggio, F., Hess, D., El-Shemerly, M., Krystyniak, A., and Pinna, L.A. (2005). Aurora-A site specificity: a study with synthetic peptide substrates. *Biochem. J.* *390*, 293–302.
- Foster, S.A., and Morgan, D.O. (2012). The APC/C Subunit Mnd2/Apc15 Promotes Cdc20 Autoubiquitination and Spindle Assembly Checkpoint Inactivation. *Mol. Cell* *47*, 921–932.
- Francisco, L., Wang, W., and Chan, C.S. (1994). Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol. Cell. Biol.* *14*, 4731–4740.
- Fraschini, R. (2001). Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *EMBO J.* *20*, 6648–6659.
- Fu, J., Bian, M., Liu, J., Jiang, Q., and Zhang, C. (2009). 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.* *106*, 6939–6944.
- Fu, J., Bian, M., Xin, G., Deng, Z., Luo, J., Guo, X., Chen, H., Wang, Y., Jiang, Q., and Zhang, C. (2015). TPX2 phosphorylation maintains metaphase spindle length by regulating microtubule flux. *J. Cell Biol.* *210*, 373–383.
- Fuerstenberg, S., Peng, C.-Y., Alvarez-Ortiz, P., Hor, T., and Doe, C.Q. (1998). Identification of Miranda Protein Domains Regulating Asymmetric Cortical Localization, Cargo Binding, and Cortical Release. *Mol. Cell. Neurosci.* *12*, 325–339.
- Fumoto, K., Lee, P.-C., Saya, H., and Kikuchi, A. (2008). AIP regulates stability of Aurora-A at early mitotic phase coordinately with GSK-3 β . *Oncogene* *27*, 4478–4487.
- Gallini, S., Carminati, M., De Mattia, F., Pirovano, L., Martini, E., Oldani, A., Asteriti, I.A., Guarguaglini, G., and

- Mapelli, M. (2016). NuMA Phosphorylation by Aurora-A Orchestrates Spindle Orientation. *Curr. Biol.* *26*, 458–469.
- Giet, R., and Prigent, C. (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci* *112*, 3591–3601.
- Giet, R., and Prigent, C. (2000). The *Xenopus laevis* Aurora/Ipl1p-Related Kinase pEg2 Participates in the Stability of the Bipolar Mitotic Spindle. *Exp. Cell Res.* *258*, 145–151.
- Giet, R., Uzbekov, R., Cubizolles, F., Guellec, K.L., and Prigent, C. (1999). The *Xenopus laevis* Aurora-related Protein Kinase pEg2 Associates with and Phosphorylates the Kinesin-related Protein XI Eg5. *J. Biol. Chem.* *274*, 15005–15013.
- Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M.J., Raff, J.W., Prigent, C., and Glover, D.M. (2002). *Drosophila* Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J. Cell Biol.* *156*, 437–451.
- Gillett, E.S., Espelin, C.W., and Sorger, P.K. (2004). Spindle checkpoint proteins and chromosome–microtubule attachment in budding yeast. *J. Cell Biol.* *164*, 535–546.
- Giubettini, M., Asteriti, I.A., Scrofani, J., Luca, M.D., Lindon, C., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2011). Control of Aurora-A stability through interaction with TPX2. *J Cell Sci* *124*, 113–122.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A., and Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell* *81*, 95–105.
- Gogondeau, D., Siudeja, K., Gambarotto, D., Penetier, C., Bardin, A.J., and Basto, R. (2015). Aneuploidy causes premature differentiation of neural and intestinal stem cells. *Nat. Commun.* *6*, 8894.
- Goldberg, S.L., Fenaux, P., Craig, M.D., Gyan, E., Lister, J., Kassis, J., Pigneux, A., Schiller, G.J., Jung, J., Jane Leonard, E., et al. (2014). An exploratory phase 2 study of investigational Aurora A kinase inhibitor alisertib (MLN8237) in acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res. Rep.* *3*, 58–61.
- Gomez-Ferreria, M.A., Rath, U., Buster, D.W., Chanda, S.K., Caldwell, J.S., Rines, D.R., and Sharp, D.J. (2007). Human Cep192 Is Required for Mitotic Centrosome and Spindle Assembly. *Curr. Biol.* *17*, 1960–1966.
- Goshima, G. (2011). Identification of a TPX2-Like Microtubule-Associated Protein in *Drosophila*. *PLoS ONE* *6*.
- Goto, H., Kiyono, T., Tomono, Y., Kawajiri, A., Urano, T., Furukawa, K., Nigg, E.A., and Inagaki, M. (2006). Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase–anaphase transition. *Nat. Cell Biol.* *8*, 180–187.
- Gruss, O.J., Carazo-Salas, R.E., Schatz, C.A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E., and Mattaj, I.W. (2001). Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin α on TPX2 Activity. *Cell* *104*, 83–93.
- Habu, T., Kim, S.H., Weinstein, J., and Matsumoto, T. (2002). Identification of a MAD2-binding protein, CMT2, and its role in mitosis. *EMBO J.* *21*, 6419–6428.
- Hammond, D., Zeng, K., Espert, A., Bastos, R.N., Baron, R.D., Gruneberg, U., and Barr, F.A. (2013). Melanoma-associated mutations in protein phosphatase 6 cause chromosome instability and DNA damage owing to dysregulated Aurora-A. *J Cell Sci* *126*, 3429–3440.
- Han, J.S., Holland, A.J., Fachinetti, D., Kulukian, A., Cetin, B., and Cleveland, D.W. (2013). Catalytic Assembly of the Mitotic Checkpoint Inhibitor BubR1-Cdc20 by a Mad2-Induced Functional Switch in Cdc20. *Mol. Cell* *51*, 92–104.
- Hanks, S., Coleman, K., Reid, S., Plaja, A., Firth, H., FitzPatrick, D., Kidd, A., Méhes, K., Nash, R., Robin, N., et al. (2004). Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. *Nat. Genet.* *36*, 1159–1161.
- Hannak, E., Kirkham, M., Hyman, A.A., and Oegema, K. (2001). Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* *155*, 1109–1116.
- Hans, F., Skoufias, D.A., Dimitrov, S., and Margolis, R.L. (2009). Molecular Distinctions between Aurora A and B: A Single Residue Change Transforms Aurora A into Correctly Localized and Functional Aurora B. *Mol. Biol. Cell* *20*, 3491–3502.
- Hardwick, K.G., Weiss, E., Luca, F.C., Winey, M., and Murray, A.W. (1996). Activation of the Budding Yeast Spindle Assembly Checkpoint Without Mitotic Spindle Disruption. *Science* *273*, 953–956.

- Hardwick, K.G., Johnston, R.C., Smith, D.L., and Murray, A.W. (2000). MAD3 Encodes a Novel Component of the Spindle Checkpoint Which Interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J. Cell Biol.* *148*, 871–882.
- Harris, L., Davenport, J., Neale, G., and Goorha, R. (2005). The mitotic checkpoint gene BubR1 has two distinct functions in mitosis. *Exp. Cell Res.* *308*, 85–100.
- Hauf, S., Cole, R.W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., Meel, J. van, Rieder, C.L., and Peters, J.-M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore–microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* *161*, 281–294.
- Haydon, C.E., Evers, P.A., Aveline-Wolf, L.D., Resing, K.A., Maller, J.L., and Ahn, N.G. (2003). Identification of Novel Phosphorylation Sites on *Xenopus laevis* Aurora A and Analysis of Phosphopeptide Enrichment by Immobilized Metal-affinity Chromatography. *Mol. Cell. Proteomics* *2*, 1055–1067.
- He, L., Yang, H., Ma, Y., Pledger, W.J., Cress, W.D., and Cheng, J.Q. (2008). Identification of Aurora-A as a Direct Target of E2F3 during G2/M Cell Cycle Progression. *J. Biol. Chem.* *283*, 31012–31020.
- Heinrich, S., Sewart, K., Windecker, H., Langeegger, M., Schmidt, N., Hustedt, N., and Hauf, S. (2014). Mad1 contribution to spindle assembly checkpoint signalling goes beyond presenting Mad2 at kinetochores. *EMBO Rep.* *15*, 291–298.
- Herzog, F., Primorac, I., Dube, P., Lenart, P., Sander, B., Mechtler, K., Stark, H., and Peters, J.-M. (2009). Structure of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Interacting with a Mitotic Checkpoint Complex. *Science* *323*, 1477–1481.
- Hewitt, L., Tighe, A., Santaguida, S., White, A.M., Jones, C.D., Musacchio, A., Green, S., and Taylor, S.S. (2010). Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1–C-Mad2 core complex. *J. Cell Biol.* *190*, 25–34.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y., and Matsuzaki, F. (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* *377*, 627–630.
- Hirota, T., Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Nitta, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2003). Aurora-A and an Interacting Activator, the LIM Protein Ajuba, Are Required for Mitotic Commitment in Human Cells. *Cell* *114*, 585–598.
- Hiruma, Y., Sacristan, C., Pachis, S.T., Adamopoulos, A., Kuijt, T., Ubbink, M., Castelmur, E. von, Perrakis, A., and Kops, G.J.P.L. (2015). Competition between MPS1 and microtubules at kinetochores regulates spindle checkpoint signaling. *Science* *348*, 1264–1267.
- Honda, K., Mihara, H., Kato, Y., Yamaguchi, A., Tanaka, H., Yasuda, H., Furukawa, K., and Urano, T. (2000). Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* *19*, 2812–2819.
- Horn, R.D.V., Chu, S., Fan, L., Yin, T., Du, J., Beckmann, R., Mader, M., Zhu, G., Toth, J., Blanchard, K., et al. (2010). Cdk1 Activity Is Required for Mitotic Activation of Aurora A during G2/M Transition of Human Cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 21849–21857.
- Horn, V., Thélou, J., Garcia, A., Albigès-Rizo, C., Block, M.R., and Viallet, J. (2007). Functional Interaction of Aurora-A and PP2A during Mitosis. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1233–1241.
- Howell, B.J., Hoffman, D.B., Fang, G., Murray, A.W., and Salmon, E.D. (2000). Visualization of Mad2 Dynamics at Kinetochores, along Spindle Fibers, and at Spindle Poles in Living Cells. *J. Cell Biol.* *150*, 1233–1250.
- Howell, B.J., McEwen, B.F., Canman, J.C., Hoffman, D.B., Farrar, E.M., Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J. Cell Biol.* *155*, 1159–1172.
- Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* *66*, 507–517.
- Hsueh, K.-W., Fu, S.-L., Huang, C.-Y.F., and Lin, C.-H. (2011). Aurora-A phosphorylates hnRNPK and disrupts its interaction with p53. *FEBS Lett.* *585*, 2671–2675.
- Hsueh, K.-W., Fu, S.-L., Chang, C.-B., Chang, Y.-L., and Lin, C.-H. (2013). A novel Aurora-A-mediated phosphorylation of p53 inhibits its interaction with MDM2. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* *1834*, 508–515.
- Hu, W., Kavanagh, J.J., Deaver, M., Johnston, D.A., Freedman, R.S., Verschraegen, C.F., and Sen, S. (2005).

- Frequent Overexpression of STK15/Aurora-A/BTAK and Chromosomal Instability in Tumorigenic Cell Cultures Derived From Human Ovarian Cancer. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* *15*, 49–57.
- Huang, H., Hittle, J., Zappacosta, F., Annan, R.S., Hershko, A., and Yen, T.J. (2008). Phosphorylation sites in BubR1 that regulate kinetochore attachment, tension, and mitotic exit. *J. Cell Biol.* *183*, 667–680.
- Huang, Y.-H., Wu, C.-C., Chou, C.-K., and Huang, C.-Y.F. (2011). A Translational Regulator, PUM2, Promotes Both Protein Stability and Kinase Activity of Aurora-A. *PLOS ONE* *6*, e19718.
- Hutterer, A., Berdnik, D., Wirtz-Peitz, F., Žigman, M., Schleiffer, A., and Knoblich, J.A. (2006). Mitotic Activation of the Kinase Aurora-A Requires Its Binding Partner Bora. *Dev. Cell* *11*, 147–157.
- Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A., and Murray, A.W. (1998). Budding Yeast Cdc20: A Target of the Spindle Checkpoint. *Science* *279*, 1041–1044.
- Ice, R.J., McLaughlin, S.L., Livengood, R.H., Culp, M.V., Eddy, E.R., Ivanov, A.V., and Pugacheva, E.N. (2013). NEDD9 depletion destabilizes Aurora A kinase and heightens the efficacy of Aurora A inhibitors: implications for treatment of metastatic solid tumors. *Cancer Res.* *73*, 3168–3180.
- Ikeda, M., Chiba, S., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2012). Furry Protein Promotes Aurora A-mediated Polo-like Kinase 1 Activation. *J. Biol. Chem.* *287*, 27670–27681.
- Ikeshima-Kataoka, H., Skeath, J.B., Nabeshima, Y., Doe, C.Q., and Matsuzaki, F. (1997). Miranda directs Prospero to a daughter cell during *Drosophila* asymmetric divisions. *Nature* *390*, 625–629.
- Ito, K., and Hotta, Y. (1992). Proliferation pattern of postembryonic neuroblasts in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* *149*, 134–148.
- Ito, D., Saito, Y., and Matsumoto, T. (2012). Centromere-tethered Mps1 pombe homolog (Mph1) kinase is a sufficient marker for recruitment of the spindle checkpoint protein Bub1, but not Mad1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 209–214.
- Iwanaga, Y., Chi, Y.-H., Miyazato, A., Sheleg, S., Haller, K., Peloponese, J.-M., Li, Y., Ward, J.M., Benezra, R., and Jeang, K.-T. (2007). Heterozygous Deletion of Mitotic Arrest-Deficient Protein 1 (MAD1) Increases the Incidence of Tumors in Mice. *Cancer Res.* *67*, 160–166.
- Izawa, D., and Pines, J. (2012). Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J. Cell Biol.* *199*, 27–37.
- Izawa, D., and Pines, J. (2015). The mitotic checkpoint complex binds a second CDC20 to inhibit active APC/C. *Nature* *517*, 631–634.
- Izumi, Y., Ohta, N., Hisata, K., Raabe, T., and Matsuzaki, F. (2006). *Drosophila* Pins-binding protein Mud regulates spindle-polarity coupling and centrosome organization. *Nat. Cell Biol.* *8*, 586–593.
- Jablonski, S.A., Chan, G.K.T., Cooke, C.A., Earnshaw, W.C., and Yen, T.J. (1998). The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* *107*, 386–396.
- Jang, C.-Y., Coppinger, J.A., Seki, A., Yates, J.R., and Fang, G. (2009). Plk1 and Aurora A regulate the depolymerase activity and the cellular localization of Kif2a. *J Cell Sci* *122*, 1334–1341.
- Jang, M.-S., Sul, J.-W., Choi, B.-J., Lee, S.-J., Suh, J.-H., Kim, N.-S., Kim, W.H., Lim, D.-S., Lee, C.-W., and Kim, E. (2008). Negative Feedback Regulation of Aurora-A via Phosphorylation of Fas-associated Factor-1. *J. Biol. Chem.* *283*, 32344–32351.
- Janssen, A., and Medema, R.H. (2013). Genetic instability: tipping the balance. *Oncogene* *32*, 4459–4470.
- Janssen, A., Kops, G.J.P.L., and Medema, R.H. (2009). Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 19108–19113.
- Janssen, A., Kops, G.J., and Medema, R.H. (2011). Targeting the Mitotic Checkpoint to Kill Tumor Cells. *Horm. Cancer* *2*, 113–116.
- Janssens, D.H., Komori, H., Grbac, D., Chen, K., Koe, C.T., Wang, H., and Lee, C.-Y. (2014). Earmuff restricts progenitor cell potential by attenuating the competence to respond to self-renewal factors. *Development* *141*, 1036–1046.
- Januschke, J., and Gonzalez, C. (2010). The interphase microtubule aster is a determinant of asymmetric division orientation in *Drosophila* neuroblasts. *J. Cell Biol.* *188*, 693–706.

- Januschke, J., Llamazares, S., Reina, J., and Gonzalez, C. (2011). *Drosophila* neuroblasts retain the daughter centrosome. *Nat. Commun.* *2*, 243.
- Januschke, J., Reina, J., Llamazares, S., Bertran, T., Rossi, F., Roig, J., and Gonzalez, C. (2013). Centrobin controls mother–daughter centriole asymmetry in *Drosophila* neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* *15*, 241–248.
- Jarman, A.P., Brand, M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1993). The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in *Drosophila* neural precursors. *Development* *119*, 19–29.
- Jeganathan, K., Malureanu, L., Baker, D.J., Abraham, S.C., and van Deursen, J.M. (2007). Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J. Cell Biol.* *179*, 255–267.
- Jelluma, N., Dansen, T.B., Sliedrecht, T., Kwiatkowski, N.P., and Kops, G.J.P.L. (2010). Release of Mps1 from kinetochores is crucial for timely anaphase onset. *J. Cell Biol.* *191*, 281–290.
- Ji, Z., Gao, H., and Yu, H. (2015). Kinetochores attachment sensed by competitive Mps1 and microtubule binding to Ndc80C. *Science* *348*, 1260–1264.
- Jia, L., Li, B., Warrington, R.T., Hao, X., Wang, S., and Yu, H. (2011). Defining pathways of spindle checkpoint silencing: functional redundancy between Cdc20 ubiquitination and p31 comet. *Mol. Biol. Cell* *22*, 4227–4235.
- Jia, L., Li, B., and Yu, H. (2016). The Bub1-Plk1 kinase complex promotes spindle checkpoint signalling through Cdc20 phosphorylation. *Nat. Commun.* *7*, 10818.
- Jiang, Y., Zhang, Y., Lees, E., and Seghezzi, W. (2003). AuroraA overexpression overrides the mitotic spindle checkpoint triggered by nocodazole, a microtubule destabilizer. *Oncogene* *22*, 8293–8301.
- Johnson, E.O., Chang, K.-H., Ghosh, S., Venkatesh, C., Giger, K., Low, P.S., and Shah, K. (2012). LIMK2 is a crucial regulator and effector of Aurora-A-kinase-mediated malignancy. *J Cell Sci* *125*, 1204–1216.
- Johnson, V.L., Scott, M.I.F., Holt, S.V., Hussein, D., and Taylor, S.S. (2004). Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J. Cell Sci.* *117*, 1577–1589.
- Johnston, C.A., Hirono, K., Prehoda, K.E., and Doe, C.Q. (2009). Identification of an Aurora-A/PinsLINKER/ Dlg Spindle Orientation Pathway using Induced Cell Polarity in S2 Cells. *Cell* *138*, 1150–1163.
- Joukov, V., Nicolo, A.D., Rodriguez, A., Walter, J.C., and Livingston, D.M. (2010). Centrosomal protein of 192 kDa (Cep192) promotes centrosome-driven spindle assembly by engaging in organelle-specific Aurora A activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 21022–21027.
- Joukov, V., Walter, J.C., and De Nicolo, A. (2014). The Cep192-Organized Aurora A-Plk1 Cascade Is Essential for Centrosome Cycle and Bipolar Spindle Assembly. *Mol. Cell* *55*, 578–591.
- Kaisari, S., Sitry-Shevah, D., Miniowitz-Shemtov, S., and Hershko, A. (2016). Intermediates in the assembly of mitotic checkpoint complexes and their role in the regulation of the anaphase-promoting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *113*, 966–971.
- Kallio, M., Weinstein, J., Daum, J.R., Burke, D.J., and Gorbsky, G.J. (1998). Mammalian p53CDC Mediates Association of the Spindle Checkpoint Protein Mad2 with the Cyclosome/Anaphase-promoting Complex, and is Involved in Regulating Anaphase Onset and Late Mitotic Events. *J. Cell Biol.* *141*, 1393–1406.
- Kallio, M.J., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., and Gorbsky, G.J. (2002). Inhibition of Aurora B Kinase Blocks Chromosome Segregation, Overrides the Spindle Checkpoint, and Perturbs Microtubule Dynamics in Mitosis. *Curr. Biol.* *12*, 900–905.
- Karess, R. (2005). Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol.* *15*, 386–392.
- Kashatus, D.F., Lim, K.-H., Brady, D.C., Pershing, N.L.K., Cox, A.D., and Counter, C.M. (2011). RALA and RALBP1 regulate mitochondrial fission at mitosis. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1108–1115.
- Kastl, J., Braun, J., Prestel, A., Möller, H.M., Huhn, T., and Mayer, T.U. (2015). Mad2 Inhibitor-1 (M2I-1): A Small Molecule Protein–Protein Interaction Inhibitor Targeting the Mitotic Spindle Assembly Checkpoint. *ACS Chem. Biol.* *10*, 1661–1666.
- Katayama, H., Zhou, H., Li, Q., Tatsuka, M., and Sen, S. (2001). Interaction and Feedback Regulation between STK15/BTAK/Aurora-A Kinase and Protein Phosphatase 1 through Mitotic Cell Division Cycle. *J. Biol. Chem.* *276*, 46219–46224.
- Katayama, H., Sasai, K., Czerniak, B.A., Carter, J.L., and Sen, S. (2007). Aurora-A kinase phosphorylation of

- Aurora-A kinase interacting protein (AIP) and stabilization of the enzyme-substrate complex. *J. Cell. Biochem.* *102*, 1318–1331.
- Katayama, H., Sasai, K., Kloc, M., Brinkley, B.R., and Sen, S. (2008). Aurora kinase-A regulates kinetochore/chromatin associated microtubule assembly in human cells. *Cell Cycle* *7*, 2691–2704.
- Katayama, H., Wang, J., Treekitkarnmongkol, W., Kawai, H., Sasai, K., Zhang, H., Wang, H., Adams, H.P., Jiang, S., Chakraborty, S.N., et al. (2012). Aurora Kinase-A Inactivates DNA Damage-Induced Apoptosis and Spindle Assembly Checkpoint Response Functions of p73. *Cancer Cell* *21*, 196–211.
- Kemmler, S., Stach, M., Knapp, M., Ortiz, J., Pfannstiel, J., Ruppert, T., and Lechner, J. (2009). Mimicking Ndc80 phosphorylation triggers spindle assembly checkpoint signalling. *EMBO J.* *28*, 1099–1110.
- Khazaei, M.R., and Püschel, A.W. (2009). Phosphorylation of the Par Polarity Complex Protein Par3 at Serine 962 Is Mediated by Aurora A and Regulates Its Function in Neuronal Polarity. *J. Biol. Chem.* *284*, 33571–33579.
- Kiat, L.S., Hui, K.M., and Gopalan, G. (2002). Aurora-A Kinase Interacting Protein (AIP), a Novel Negative Regulator of Human Aurora-A Kinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 45558–45565.
- Kim, S., Sun, H., Tomchick, D.R., Yu, H., and Luo, X. (2012). Structure of human Mad1 C-terminal domain reveals its involvement in kinetochore targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 6549–6554.
- Kim, S.H., Lin, D.P., Matsumoto, S., Kitazono, A., and Matsumoto, T. (1998). Fission Yeast Slp1: An Effector of the Mad2-Dependent Spindle Checkpoint. *Science* *279*, 1045–1047.
- Kimura, M., Kotani, S., Hattori, T., Sumi, N., Yoshioka, T., Todokoro, K., and Okano, Y. (1997). Cell Cycle-dependent Expression and Spindle Pole Localization of a Novel Human Protein Kinase, Aik, Related to Aurora of *Drosophila* and Yeast Ipl1. *J. Biol. Chem.* *272*, 13766–13771.
- King, E.M.J., Sar, S.J.A. van der, and Hardwick, K.G. (2007). Mad3 KEN Boxes Mediate both Cdc20 and Mad3 Turnover, and Are Critical for the Spindle Checkpoint. *PLOS ONE* *2*, e342.
- Kinoshita, K., Noetzel, T.L., Pelletier, L., Mechtler, K., Drechsel, D.N., Schwager, A., Lee, M., Raff, J.W., and Hyman, A.A. (2005). Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *J. Cell Biol.* *170*, 1047–1055.
- Kitagawa, R., and Rose, A.M. (1999). Components of the spindle-assembly checkpoint are essential in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* *1*, 514–521.
- Kitajima, S., Kudo, Y., Ogawa, I., Tatsuka, M., Kawai, H., Pagano, M., and Takata, T. (2007). Constitutive Phosphorylation of Aurora-A on Ser51 Induces Its Stabilization and Consequent Overexpression in Cancer. *PLOS ONE* *2*, e944.
- Knoblich, J.A., Jan, and Nung Jan, Y. (1995). Asymmetric segregation of Numb and Prospero during cell division. *Nature* *377*, 624–627.
- Koe, C.T., Li, S., Rossi, F., Wong, J.J.L., Wang, Y., Zhang, Z., Chen, K., Aw, S.S., Richardson, H.E., Robson, P., et al. (2014). The Brm-HDAC3-Erm repressor complex suppresses dedifferentiation in *Drosophila* type II neuroblast lineages. *eLife* *3*.
- Komori, H., Xiao, Q., Janssens, D.H., Dou, Y., and Lee, C.-Y. (2014). Trithorax maintains the functional heterogeneity of neural stem cells through the transcription factor Buttonhead. *eLife* *3*, e03502.
- Kornev, A.P., and Taylor, S.S. (2010). Defining the Conserved Internal Architecture of a Protein Kinase. *Biochim. Biophys. Acta* *1804*, 440–444.
- Kotani, S., Tugendreich, S., Fujii, M., Jorgensen, P.-M., Watanabe, N., Hoog, C., Hieter, P., and Todokoro, K. (1998). PKA and MPF-Activated Polo-like Kinase Regulate Anaphase-Promoting Complex Activity and Mitosis Progression. *Mol. Cell* *1*, 371–380.
- Kraut, R., Chia, W., Jan, L.Y., Jan, Y.N., and Knoblich, J.A. (1996). Role of inscuteable in orienting asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Nature* *383*, 50–55.
- Krenn, V., Overlack, K., Primorac, I., van Gerwen, S., and Musacchio, A. (2014). KI Motifs of Human Knl1 Enhance Assembly of Comprehensive Spindle Checkpoint Complexes around MELT Repeats. *Curr. Biol.* *24*, 29–39.
- Kress, E., Schwager, F., Holtackers, R., Seiler, J., Prodon, F., Zanin, E., Eiteneuer, A., Toya, M., Sugimoto, A., Meyer, H., et al. (2013). The UBXN-2/p37/p47 adaptors of CDC-48/p97 regulate mitosis by limiting the centrosomal recruitment of Aurora A. *J. Cell Biol.* *201*, 559–575.

- Kruse, T., Larsen, M.S.Y., Sedgwick, G.G., Sigurdsson, J.O., Streicher, W., Olsen, J.V., and Nilsson, J. (2014). A direct role of Mad1 in the spindle assembly checkpoint beyond Mad2 kinetochore recruitment. *EMBO Rep.* *15*, 282–290.
- Kufer, T.A., Silljé, H.H.W., Körner, R., Gruss, O.J., Meraldi, P., and Nigg, E.A. (2002). Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle. *J. Cell Biol.* *158*, 617–623.
- Kuijt, T.E.F., Omerzu, M., Saurin, A.T., and Kops, G.J.P.L. (2014). Conditional targeting of MAD1 to kinetochores is sufficient to reactivate the spindle assembly checkpoint in metaphase. *Chromosoma* *123*, 471–480.
- Kulukian, A., Han, J.S., and Cleveland, D.W. (2009). Unattached Kinetochores Catalyze Production of an Anaphase Inhibitor that Requires a Mad2 Template to Prime Cdc20 for BubR1 Binding. *Dev. Cell* *16*, 105–117.
- Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H., and Hirota, T. (2003). CENP-A Phosphorylation by Aurora-A in Prophase Is Required for Enrichment of Aurora-B at Inner Centromeres and for Kinetochore Function. *Dev. Cell* *5*, 853–864.
- Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., and Kapoor, T.M. (2004). Correcting improper chromosome–spindle attachments during cell division. *Nat. Cell Biol.* *6*, 232–237.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S.L., Rosasco, S.E., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E., and Stukenberg, P.T. (2004). Aurora B Phosphorylates Centromeric MCAK and Regulates Its Localization and Microtubule Depolymerization Activity. *Curr. Biol.* *14*, 273–286.
- Lara-Gonzalez, P., Scott, M.I.F., Diez, M., Sen, O., and Taylor, S.S. (2011). BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *J Cell Sci* *124*, 4332–4345.
- Lau, D.T.C., and Murray, A.W. (2012). Mad2 and Mad3 Cooperate to Arrest Budding Yeast in Mitosis. *Curr. Biol.* *22*, 180–190.
- Lee, M., and Vasioukhin, V. (2008). Cell polarity and cancer – cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor. *J. Cell Sci.* *121*, 1141–1150.
- Lee, C.-Y., Andersen, R.O., Cabernard, C., Manning, L., Tran, K.D., Lanskey, M.J., Bashirullah, A., and Doe, C.Q. (2006a). *Drosophila* Aurora-A kinase inhibits neuroblast self-renewal by regulating aPKC/Numb cortical polarity and spindle orientation. *Genes Dev.* *20*, 3464–3474.
- Lee, C.-Y., Robinson, K.J., and Doe, C.Q. (2006b). Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation. *Nature* *439*, 594–598.
- Lee, C.-Y., Wilkinson, B.D., Siegrist, S.E., Wharton, R.P., and Doe, C.Q. (2006c). Brat Is a Miranda Cargo Protein that Promotes Neuronal Differentiation and Inhibits Neuroblast Self-Renewal. *Dev. Cell* *10*, 441–449.
- Lee, Y.-C., Que, J., Chen, Y.-C., Lin, J.-T., Liou, Y.-C., Liao, P.-C., Liu, Y.-P., Lee, K.-H., Lin, L.-C., Hsiao, M., et al. (2013). Pin1 acts as a negative regulator of the G2/M transition by interacting with the Aurora-A–Bora complex. *J Cell Sci* *126*, 4862–4872.
- Lerit, D.A., and Rusan, N.M. (2013). PLP inhibits the activity of interphase centrosomes to ensure their proper segregation in stem cells. *J. Cell Biol.* *202*, 1013–1022.
- LeRoy, P.J., Hunter, J.J., Hoar, K.M., Burke, K.E., Shinde, V., Ruan, J., Bowman, D., Galvin, K., and Ecsedy, J.A. (2007). Localization of Human TACC3 to Mitotic Spindles Is Mediated by Phosphorylation on Ser558 by Aurora A: A Novel Pharmacodynamic Method for Measuring Aurora A Activity. *Cancer Res.* *67*, 5362–5370.
- Leuken, R. van, Clijsters, L., Zon, W. van, Lim, D., Yao, X., Wolthuis, R.M.F., Yaffe, M.B., Medema, R.H., and Vugt, M.A.T.M. van (2009). Polo-Like Kinase-1 Controls Aurora A Destruction by Activating APC/C-Cdh1. *PLOS ONE* *4*, e5282.
- Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* *66*, 519–531.
- Li, X., and Nicklas, R.B. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* *373*, 630–632.
- Li, M., Fang, X., Baker, D.J., Guo, L., Gao, X., Wei, Z., Han, S., Deursen, J.M. van, and Zhang, P. (2010). The ATM–p53 pathway suppresses aneuploidy-induced tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 14188–14193.
- Li, S., Wang, H., and Groth, C. (2014). *Drosophila* neuroblasts as a new model for the study of stem cell self-renewal and tumour formation. *Biosci. Rep.* *34*.
- Li, S., Deng, Z., Fu, J., Xu, C., Xin, G., Wu, Z., Luo, J., Wang, G., Zhang, S., Zhang, B., et al. (2015). Spatial Compartmentalization Specializes the Function of Aurora A and Aurora B. *J. Biol. Chem.* *290*, 17546–17558.

- Li, X., Xie, Y., and Zhu, S. (2016). Notch maintains *Drosophila* type II neuroblasts by suppressing the expression of the Fez transcription factor Earmuff. *Development* *143*, 136184.
- Lieu, A.-S., Cheng, T.-S., Chou, C.-H., Wu, C.-H., Hsu, C.-Y., Huang, C.-Y.F., Chang, L.-K., Loh, J.-K., Chang, C.-S., Hsu, C.-M., et al. (2010). Functional characterization of AIBp, a novel Aurora-A binding protein in centrosome structure and spindle formation. *Int. J. Oncol.* *37*, 429–436.
- Lim, S.K., and Gopalan, G. (2007a). Aurora-A kinase interacting protein 1 (AURKAIP1) promotes Aurora-A degradation through an alternative ubiquitin-independent pathway. *Biochem. J.* *403*, 119–127.
- Lim, S.K., and Gopalan, G. (2007b). Antizyme1 mediates AURKAIP1-dependent degradation of Aurora-A. *Oncogene* *26*, 6593–6603.
- Lim, K.-H., Brady, D.C., Kashatus, D.F., Ancrile, B.B., Der, C.J., Cox, A.D., and Counter, C.M. (2010). Aurora-A Phosphorylates, Activates, and Relocalizes the Small GTPase RalA. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 508–523.
- Lim, N.R., Yeap, Y.Y.C., Zhao, T.T., Yip, Y.Y., Wong, S.C., Xu, D., Ang, C.-S., Williamson, N.A., Xu, Z., Bogoyevitch, M.A., et al. (2015). Opposing roles for JNK and Aurora A in regulating the association of WDR62 with spindle microtubules. *J Cell Sci* *128*, 527–540.
- Lim, N.R., Yeap, Y.Y.C., Ang, C.-S., Williamson, N.A., Bogoyevitch, M.A., Quinn, L.M., and Ng, D.C.H. (2016). Aurora A phosphorylation of WD40-repeat protein 62 in mitotic spindle regulation. *Cell Cycle* *15*, 413–424.
- Lioutas, A., and Vernos, I. (2013). Aurora A kinase and its substrate TACC3 are required for central spindle assembly. *EMBO Rep.* *14*, 829–836.
- Littlepage, L.E., and Ruderman, J.V. (2002). 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.* *16*, 2274–2285.
- Littlepage, L.E., Wu, H., Andresson, T., Deanehan, J.K., Amundadottir, L.T., and Ruderman, J.V. (2002). Identification of phosphorylated residues that affect the activity of the mitotic kinase Aurora-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15440–15445.
- Liu, D., Vader, G., Vromans, M.J.M., Lampson, M.A., and Lens, S.M.A. (2009). Sensing Chromosome Bi-Orientation by Spatial Separation of Aurora B Kinase from Kinetochores. *Science* *323*, 1350–1353.
- Liu, D., Vleugel, M., Backer, C.B., Hori, T., Fukagawa, T., Cheeseman, I.M., and Lampson, M.A. (2010). Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *J. Cell Biol.* *188*, 809–820.
- Liu, L., Guo, C., Dammann, R., Tommasi, S., and Pfeifer, G.P. (2008). RASSF1A interacts with and activates the mitotic kinase Aurora-A. *Oncogene* *27*, 6175–6186.
- Liu, Q., Kaneko, S., Yang, L., Feldman, R.I., Nicosia, S.V., Chen, J., and Cheng, J.Q. (2004). Aurora-A Abrogation of p53 DNA Binding and Transactivation Activity by Phosphorylation of Serine 215. *J. Biol. Chem.* *279*, 52175–52182.
- Liu, S.-T., Chan, G.K.T., Hittle, J.C., Fujii, G., Lees, E., and Yen, T.J. (2003). Human MPS1 Kinase Is Required for Mitotic Arrest Induced by the Loss of CENP-E from Kinetochores. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1638–1651.
- Llamazares, S., Moreira, A., Tavares, A., Girdham, C., Spruce, B.A., Gonzalez, C., Karess, R.E., Glover, D.M., and Sunkel, C.E. (1991). polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* *5*, 2153–2165.
- London, N., and Biggins, S. (2014a). Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 736–748.
- London, N., and Biggins, S. (2014b). Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes Dev.* *28*, 140–152.
- London, N., Ceto, S., Ranish, J.A., and Biggins, S. (2012). Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 Regulates Bub1 Localization to Kinetochores. *Curr. Biol.* *22*, 900–906.
- Lu, M.S., and Johnston, C.A. (2013). Molecular pathways regulating mitotic spindle orientation in animal cells. *Development* *140*, 1843–1856.
- Lu, B., Rothenberg, M., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1998). Partner of Numb Colocalizes with Numb during Mitosis and Directs Numb Asymmetric Localization in *Drosophila* Neural and Muscle Progenitors. *Cell* *95*, 225–235.

- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., and Yu, H. (2002). The Mad2 Spindle Checkpoint Protein Undergoes Similar Major Conformational Changes Upon Binding to Either Mad1 or Cdc20. *Mol. Cell* *9*, 59–71.
- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J., and Yu, H. (2004). The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 338–345.
- Ma, H.T., and Poon, R.Y.C. (2016). TRIP13 Regulates Both the Activation and Inactivation of the Spindle-Assembly Checkpoint. *Cell Rep.* *14*, 1086–1099.
- Ma, N., Matsunaga, S., Morimoto, A., Sakashita, G., Urano, T., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2011). 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* *124*, 394–404.
- Maciejowski, J., George, K.A., Terret, M.-E., Zhang, C., Shokat, K.M., and Jallepalli, P.V. (2010). Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J. Cell Biol.* *190*, 89–100.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* *455*, 119–123.
- Malureanu, L.A., Jeganathan, K.B., Hamada, M., Wasilewski, L., Davenport, J., and van Deursen, J.M. (2009). BubR1 N Terminus Acts as a Soluble Inhibitor of Cyclin B Degradation by APC/CCdc20 in Interphase. *Dev. Cell* *16*, 118–131.
- Mansfeld, J., Collin, P., Collins, M.O., Choudhary, J.S., and Pines, J. (2011). APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1234–1243.
- Mao, Y., Abrieu, A., and Cleveland, D.W. (2003). Activating and Silencing the Mitotic Checkpoint through CENP-E-Dependent Activation/Inactivation of BubR1. *Cell* *114*, 87–98.
- Mao, Y., Desai, A., and Cleveland, D.W. (2005). Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling. *J. Cell Biol.* *170*, 873–880.
- Mapelli, M., Filipp, F.V., Rancati, G., Massimiliano, L., Nezi, L., Stier, G., Hagan, R.S., Confalonieri, S., Piatti, S., Sattler, M., et al. (2006). Determinants of conformational dimerization of Mad2 and its inhibition by p31 comet. *EMBO J.* *25*, 1273–1284.
- Maresca, T.J., and Salmon, E.D. (2009). Intrakinetochore stretch is associated with changes in kinetochore phosphorylation and spindle assembly checkpoint activity. *J. Cell Biol.* *184*, 373–381.
- Marumoto, T., Hirota, T., Morisaki, T., Kunitoku, N., Zhang, D., Ichikawa, Y., Sasayama, T., Kuninaka, S., Mimori, T., Tamaki, N., et al. (2002). Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. *Genes Cells* *7*, 1173–1182.
- Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E., and Saya, H. (2003). Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic Events in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 51786–51795.
- Mathieu, J., Cauvin, C., Moch, C., Radford, S.J., Sampaio, P., Perdigoto, C.N., Schweisguth, F., Bardin, A.J., Sunkel, C.E., McKim, K., et al. (2013). Aurora B and Cyclin B Have Opposite Effects on the Timing of Cytokinesis Abscission in *Drosophila* Germ Cells and in Vertebrate Somatic Cells. *Dev. Cell* *26*, 250–265.
- Maton, G., Thibier, C., Castro, A., Lorca, T., Prigent, C., and Jesus, C. (2003). Cdc2-Cyclin B Triggers H3 Kinase Activation of Aurora-A in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* *278*, 21439–21449.
- Maton, G., Lorca, T., Girault, J.-A., Ozon, R., and Jesus, C. (2005). Differential regulation of Cdc2 and Aurora-A in *Xenopus* oocytes: a crucial role of phosphatase 2A. *J. Cell Sci.* *118*, 2485–2494.
- Matsumura, S., Toyoshima, F., and Nishida, E. (2007). Polo-like Kinase 1 Facilitates Chromosome Alignment during Prometaphase through BubR1. *J. Biol. Chem.* *282*, 15217–15227.
- Matsuzaki, F., Ohshiro, T., Ikeshima-Kataoka, H., and Izumi, H. (1998). miranda localizes staufer and prospero asymmetrically in mitotic neuroblasts and epithelial cells in early *Drosophila* embryogenesis. *Development* *125*, 4089–4098.
- Meadows, J.C., Shepperd, L.A., Vanoosthuysen, V., Lancaster, T.C., Sochaj, A.M., Buttrick, G.J., Hardwick, K.G., and Millar, J.B.A. (2011). Spindle Checkpoint Silencing Requires Association of PP1 to Both Spc7 and Kinesin-8 Motors. *Dev. Cell* *20*, 739–750.

- Megraw, T.L., Kao, L.-R., and Kaufman, T.C. (2001). Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Curr. Biol.* *11*, 116–120.
- Melichar, B., Adenis, A., Lockhart, A.C., Bennouna, J., Dees, E.C., Kayaleh, O., Obermannova, R., DeMichele, A., Zatloukal, P., Zhang, B., et al. (2015). Safety and activity of alisertib, an investigational aurora kinase A inhibitor, in patients with breast cancer, small-cell lung cancer, non-small-cell lung cancer, head and neck squamous-cell carcinoma, and gastro-oesophageal adenocarcinoma: a five-arm phase 2 study. *Lancet Oncol.* *16*, 395–405.
- Meraldi, P., and Sorger, P.K. (2005). A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *EMBO J.* *24*, 1621–1633.
- Meraldi, P., Honda, R., and Nigg, E.A. (2002). Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J.* *21*, 483–492.
- Meraldi, P., Draviam, V.M., and Sorger, P.K. (2004). Timing and Checkpoints in the Regulation of Mitotic Progression. *Dev. Cell* *7*, 45–60.
- Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J.D., and Cleveland, D.W. (1996). A Complex of NuMA and Cytoplasmic Dynein Is Essential for Mitotic Spindle Assembly. *Cell* *87*, 447–458.
- Mertens, F., Johansson, B., and Mitelman, F. (1994). Isochromosomes in neoplasia. *Genes. Chromosomes Cancer* *10*, 221–230.
- Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P.K., Murty, V.V.V.S., and Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* *409*, 355–359.
- Miniowitz-Shemtov, S., Eytan, E., Ganoh, D., Sitry-Shevah, D., Dumin, E., and Hershko, A. (2012). Role of phosphorylation of Cdc20 in p31comet-stimulated disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 8056–8060.
- Moghe, S., Jiang, F., Miura, Y., Cerny, R.L., Tsai, M.-Y., and Furukawa, M. (2012). The CUL3-KLHL18 ligase regulates mitotic entry and ubiquitylates Aurora-A. *Biol. Open* *1*, 82–91.
- Molli, P.R., Li, D.-Q., Bagheri-Yarmand, R., Pakala, S.B., Katayama, H., Sen, S., Iyer, J., Chernoff, J., Tsai, M.-Y., Nair, S.S., et al. (2010). Arpc1b, a centrosomal protein, is both an activator and substrate of Aurora A. *J. Cell Biol.* *190*, 101–114.
- Moon, W., and Matsuzaki, F. (2013). Aurora A kinase negatively regulates Rho-kinase by phosphorylation in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *435*, 610–615.
- Mori, D., Yano, Y., Toyo-oka, K., Yoshida, N., Yamada, M., Muramatsu, M., Zhang, D., Saya, H., Toyoshima, Y.Y., Kinoshita, K., et al. (2007). NDEL1 Phosphorylation by Aurora-A Kinase Is Essential for Centrosomal Maturation, Separation, and TACC3 Recruitment. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 352–367.
- Mori, D., Yamada, M., Mimori-Kiyosue, Y., Shirai, Y., Suzuki, A., Ohno, S., Saya, H., Wynshaw-Boris, A., and Hirotsune, S. (2009). An essential role of the aPKC–Aurora A–NDEL1 pathway in neurite elongation by modulation of microtubule dynamics. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1057–1068.
- Mosquera, J., Armisen, R., Zhao, H., Rojas, D.A., Maldonado, E., Tapia, J.C., Colombo, A., Hayman, M.J., and Marcelain, K. (2011). Identification of Ski as a target for Aurora A kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *409*, 539–543.
- Moustafa-Kamal, M., Gamache, I., Lu, Y., Li, S., and Teodoro, J.G. (2013). BimEL is phosphorylated at mitosis by Aurora A and targeted for degradation by β TrCP1. *Cell Death Differ.* *20*, 1393–1403.
- Moyle, M.W., Kim, T., Hattersley, N., Espeut, J., Cheerambathur, D.K., Oegema, K., and Desai, A. (2014). A Bub1–Mad1 interaction targets the Mad1–Mad2 complex to unattached kinetochores to initiate the spindle checkpoint. *J. Cell Biol.* *204*, 647–657.
- Mukherjee, S., Tucker-Burden, C., Zhang, C., Moberg, K., Read, R., Hadjipanayis, C., and Brat, D.J. (2016). *Drosophila* Brat and Human Ortholog TRIM3 Maintain Stem Cell Equilibrium and Suppress Brain Tumorigenesis by Attenuating Notch Nuclear Transport. *Cancer Res.* *76*, 2443–2452.
- Nezi, L., Rancati, G., Antoni, A.D., Pasqualato, S., Piatti, S., and Musacchio, A. (2006). Accumulation of Mad2–Cdc20 complex during spindle checkpoint activation requires binding of open and closed conformers of Mad2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *174*, 39–51.

- Nielsen, B.S., Malinda, R.R., Schmid, F.M., Pedersen, S.F., Christensen, S.T., and Pedersen, L.B. (2015). PDGFR β and oncogenic mutant PDGFR α D842V promote disassembly of primary cilia through a PLC γ - and AURKA-dependent mechanism. *J Cell Sci* *128*, 3543–3549.
- Nijenhuis, W., Castelmur, E. von, Littler, D., Marco, V.D., Tromer, E., Vleugel, M., Osch, M.H.J. van, Snel, B., Perrakis, A., and Kops, G.J.P.L. (2013). A TPR domain-containing N-terminal module of MPS1 is required for its kinetochore localization by Aurora B. *J. Cell Biol.* *201*, 217–231.
- Nijenhuis, W., Vallardi, G., Teixeira, A., Kops, G.J.P.L., and Saurin, A.T. (2014). Negative feedback at kinetochores underlies a responsive spindle checkpoint signal. *Nat. Cell Biol.* *16*, 1257–1264.
- Nikonova, A.S., Astsaturov, I., Serebriiskii, I.G., Dunbrack, R.L., and Golemis, E.A. (2013). Aurora-A kinase (AURKA) in normal and pathological cell growth. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *70*, 661–687.
- Nilsson, J., Yekezare, M., Minshull, J., and Pines, J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1411–1420.
- Nipper, R.W., Siller, K.H., Smith, N.R., Doe, C.Q., and Prehoda, K.E. (2007). Gai generates multiple Pins activation states to link cortical polarity and spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 14306–14311.
- O'Connor-Giles, K.M., and Skeath, J.B. (2003). Numb Inhibits Membrane Localization of Sanpodo, a Four-Pass Transmembrane Protein, to Promote Asymmetric Divisions in *Drosophila*. *Dev. Cell* *5*, 231–243.
- Ogawa, H., Ohta, N., Moon, W., and Matsuzaki, F. (2009). Protein phosphatase 2A negatively regulates aPKC signaling by modulating phosphorylation of Par-6 in *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *J. Cell Sci.* *122*, 3242–3249.
- Oliveira, R.A., Kotadia, S., Tavares, A., Mirkovic, M., Bowlin, K., Eichinger, C.S., Nasmyth, K., and Sullivan, W. (2014). Centromere-Independent Accumulation of Cohesin at Ectopic Heterochromatin Sites Induces Chromosome Stretching during Anaphase. *PLOS Biol* *12*, e1001962.
- Ouyang, Y., Petritsch, C., Wen, H., Jan, L., Jan, Y.N., and Lu, B. (2011). Dronc caspase exerts a non-apoptotic function to restrain phospho-Numb-induced ectopic neuroblast formation in *Drosophila*. *Development* *138*, 2185–2196.
- Overlack, K., Primorac, I., Vleugel, M., Krenn, V., Maffini, S., Hoffmann, I., Kops, G.J.P.L., and Musacchio, A. (2015). A molecular basis for the differential roles of Bub1 and BubR1 in the spindle assembly checkpoint. *eLife* *4*, e05269.
- Özlü, N., Srayko, M., Kinoshita, K., Habermann, B., O'Toole, E.T., Müller-Reichert, T., Schmalz, N., Desai, A., and Hyman, A.A. (2005). An Essential Function of the *C. elegans* Ortholog of TPX2 Is to Localize Activated Aurora A Kinase to Mitotic Spindles. *Dev. Cell* *9*, 237–248.
- Pascreau, G., Delcros, J.-G., Morin, N., Prigent, C., and Arlot-Bonnemains, Y. (2008). Aurora-A kinase Ser349 phosphorylation is required during *Xenopus laevis* oocyte maturation. *Dev. Biol.* *317*, 523–530.
- Persico, A., Cervigni, R.I., Barretta, M.L., Corda, D., and Colanzi, A. (2010). Golgi Partitioning Controls Mitotic Entry through Aurora-A Kinase. *Mol. Biol. Cell* *21*, 3708–3721.
- Peset, I., Seiler, J., Sardon, T., Bejarano, L.A., Rybina, S., and Vernos, I. (2005). Function and regulation of Maskin, a TACC family protein, in microtubule growth during mitosis. *J. Cell Biol.* *170*, 1057–1066.
- Pinsky, B.A., Kung, C., Shokat, K.M., and Biggins, S. (2006). The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat. Cell Biol.* *8*, 78–83.
- Pinsky, B.A., Nelson, C.R., and Biggins, S. (2009). Protein Phosphatase 1 Regulates Exit from the Spindle Checkpoint in Budding Yeast. *Curr. Biol.* *19*, 1182–1187.
- Pinyol, R., Scrofani, J., and Vernos, I. (2013). The Role of NEDD1 Phosphorylation by Aurora A in Chromosomal Microtubule Nucleation and Spindle Function. *Curr. Biol.* *23*, 143–149.
- Platani, M., Trinkle-Mulcahy, L., Porter, M., Jeyaprakash, A.A., and Earnshaw, W.C. (2015). Mio depletion links mTOR regulation to Aurora A and Plk1 activation at mitotic centrosomes. *J. Cell Biol.* *210*, 45–62.
- Plotnikova, O.V., Pugacheva, E.N., Dunbrack, R.L., and Golemis, E.A. (2010). Rapid calcium-dependent activation of Aurora-A kinase. *Nat. Commun.* *1*, 64.
- Plotnikova, O.V., Nikonova, A.S., Loskutov, Y.V., Kozyulina, P.Y., Pugacheva, E.N., and Golemis, E.A. (2012). Calmodulin activation of Aurora-A kinase (AURKA) is required during ciliary disassembly and in mitosis. *Mol.*

- Biol. Cell 23, 2658–2670.
- Primorac, I., Weir, J.R., Chiroli, E., Gross, F., Hoffmann, I., Gerwen, S. van, Ciliberto, A., and Musacchio, A. (2013). Bub3 reads phosphorylated MELT repeats to promote spindle assembly checkpoint signaling. *eLife* 2, e01030.
- Pugacheva, E.N., and Golemis, E.A. (2005). The focal adhesion scaffolding protein HEF1 regulates activation of the Aurora-A and Nek2 kinases at the centrosome. *Nat. Cell Biol.* 7, 937–946.
- Pugacheva, E.N., Jablonski, S.A., Hartman, T.R., Henske, E.P., and Golemis, E.A. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129, 1351–1363.
- Qi, W., Tang, Z., and Yu, H. (2006). Phosphorylation- and Polo-Box-dependent Binding of Plk1 to Bub1 Is Required for the Kinetochore Localization of Plk1. *Mol. Biol. Cell* 17, 3705–3716.
- Qiao, R., Weissmann, F., Yamaguchi, M., Brown, N.G., VanderLinden, R., Imre, R., Jarvis, M.A., Brunner, M.R., Davidson, I.F., Litos, G., et al. (2016). Mechanism of APC/CCDC20 activation by mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, E2570–E2578.
- Rahmani, Z., Gagou, M.E., Lefebvre, C., Emre, D., and Karess, R.E. (2009). Separating the spindle, checkpoint, and timer functions of BubR1. *J. Cell Biol.* 187, 597–605.
- Ramdas Nair, A., Singh, P., Salvador Garcia, D., Rodriguez-Crespo, D., Egger, B., and Cabernard, C. (2016). The Microcephaly-Associated Protein Wdr62/CG7337 Is Required to Maintain Centrosome Asymmetry in *Drosophila* Neuroblasts. *Cell Rep.* 14, 1100–1113.
- Rebollo, E., Sampaio, P., Januschke, J., Llamazares, S., Varmark, H., and González, C. (2007). Functionally Unequal Centrosomes Drive Spindle Orientation in Asymmetrically Dividing *Drosophila* Neural Stem Cells. *Dev. Cell* 12, 467–474.
- Reboutier, D., Troadec, M.-B., Cremet, J.-Y., Fukasawa, K., and Prigent, C. (2012). Nucleophosmin/B23 activates Aurora A at the centrosome through phosphorylation of serine 89. *J. Cell Biol.* 197, 19–26.
- Reboutier, D., Troadec, M.-B., Cremet, J.-Y., Chauvin, L., Guen, V., Salaun, P., and Prigent, C. (2013). Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150Glued. *J. Cell Biol.* 201, 65–79.
- Reddy, S.K., Rape, M., Margansky, W.A., and Kirschner, M.W. (2007). Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* 446, 921–925.
- Ricke, R.M., Jeganathan, K.B., and Deursen, J.M. van (2011). Bub1 overexpression induces aneuploidy and tumor formation through Aurora B kinase hyperactivation. *J. Cell Biol.* 193, 1049–1064.
- Rieder, C.L., Schultz, A., Cole, R., and Sluder, G. (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J. Cell Biol.* 127, 1301–1310.
- Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A., and Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* 130, 941–948.
- Rischitor, P.E., May, K.M., and Hardwick, K.G. (2007). Bub1 Is a Fission Yeast Kinetochore Scaffold Protein, and Is Sufficient to Recruit other Spindle Checkpoint Proteins to Ectopic Sites on Chromosomes. *PLOS ONE* 2, e1342.
- Ritchey, L., Ottman, R., Roumanos, M., and Chakrabarti, R. (2012). A functional cooperativity between Aurora A kinase and LIM kinase1. *Cell Cycle* 11, 296–309.
- Rivas, S., Armisen, R., Rojas, D.A., Maldonado, E., Huerta, H., Tapia, J.C., Espinoza, J., Colombo, A., Michea, L., Hayman, M.J., et al. (2016). The Ski Protein is Involved in the Transformation Pathway of Aurora Kinase A. *J. Cell. Biochem.* 117, 334–343.
- Roghi, C., Giet, R., Uzbekov, R., Morin, N., Chartrain, I., Guellec, R.L., Couturier, A., Doree, M., Philippe, M., and Prigent, C. (1998). 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.* 111, 557–572.
- Romé, P., Montembault, E., Franck, N., Pascal, A., Glover, D.M., and Giet, R. (2010). Aurora A contributes to p150glued phosphorylation and function during mitosis. *J. Cell Biol.* 189, 651–659.
- Rong, R., Jiang, L.Y., Sheikh, M.S., and Huang, Y. (2007). Mitotic kinase Aurora-A phosphorylates RASSF1A and modulates RASSF1A-mediated microtubule interaction and M-phase cell cycle regulation. *Oncogene* 26, 7700–

- Rosenberg, J.S., Cross, F.R., and Funabiki, H. (2011). KNL1/Spc105 Recruits PP1 to Silence the Spindle Assembly Checkpoint. *Curr. Biol.* *21*, 942–947.
- Rossio, V., Michimoto, T., Sasaki, T., Ohbayashi, I., Kikuchi, Y., and Yoshida, S. (2013). Nuclear PP2A-Cdc55 prevents APC-Cdc20 activation during the spindle assembly checkpoint. *J Cell Sci* *126*, 4396–4405.
- Rusan, N.M., and Peifer, M. (2007). A role for a novel centrosome cycle in asymmetric cell division. *J. Cell Biol.* *177*, 13–20.
- Sabino, D., Brown, N.H., and Basto, R. (2011). *Drosophila* Ajuba is not an Aurora-A activator but is required to maintain Aurora-A at the centrosome. *J Cell Sci* *124*, 1156–1166.
- San-Juán, B.P., and Baonza, A. (2011). The bHLH factor deadpan is a direct target of Notch signaling and regulates neuroblast self-renewal in *Drosophila*. *Dev. Biol.* *352*, 70–82.
- Sankaran, S., Crone, D.E., Palazzo, R.E., and Parvin, J.D. (2007). Aurora-A Kinase Regulates Breast Cancer-Associated Gene 1 Inhibition of Centrosome-Dependent Microtubule Nucleation. *Cancer Res.* *67*, 11186–11194.
- Santaguida, S., Tighe, A., D'Alise, A.M., Taylor, S.S., and Musacchio, A. (2010). Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J. Cell Biol.* *190*, 73–87.
- Santaguida, S., Vernieri, C., Villa, F., Ciliberto, A., and Musacchio, A. (2011). Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction: Aurora B is directly implicated in spindle checkpoint. *EMBO J.* *30*, 1508–1519.
- Satinover, D.L., Leach, C.A., Stukenberg, P.T., and Brautigan, D.L. (2004). Activation of Aurora-A kinase by protein phosphatase inhibitor-2, a bifunctional signaling protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8625–8630.
- Saurin, A.T., van der Waal, M.S., Medema, R.H., Lens, S.M.A., and Kops, G.J.P.L. (2011). Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nat. Commun.* *2*, 316.
- Sawin, K.E., and Mitchison, T.J. (1995). Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4289–4293.
- Schaefer, M., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Knoblich, J.A. (2000). A protein complex containing Inscuteable and the $G\alpha$ -binding protein Pins orients asymmetric cell divisions in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *10*, 353–362.
- Schliekelman, M., Cowley, D.O., O'Quinn, R., Oliver, T.G., Lu, L., Salmon, E.D., and Dyke, T.V. (2009). Impaired Bub1 Function In vivo Compromises Tension-Dependent Checkpoint Function Leading to Aneuploidy and Tumorigenesis. *Cancer Res.* *69*, 45–54.
- Schober, M., Schaefer, M., and Knoblich, J.A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* *402*, 548–551.
- Schumacher, J.M., Ashcroft, N., Donovan, P.J., and Golden, A. (1998). A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* *125*, 4391–4402.
- Schvartzman, J.-M., Duijf, P.H.G., Sotillo, R., Coker, C., and Benezra, R. (2011). Mad2 Is a Critical Mediator of the Chromosome Instability Observed upon Rb and p53 Pathway Inhibition. *Cancer Cell* *19*, 701–714.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.-Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008). Bora and Aurora A Cooperatively Activate Plk1 and Control the Entry into Mitosis. *Science* *320*, 1655–1658.
- Shah, J.V., Botvinick, E., Bonday, Z., Furnari, F., Berns, M., and Cleveland, D.W. (2004). Dynamics of Centromere and Kinetochores: Implications for Checkpoint Signaling and Silencing. *Curr. Biol.* *14*, 942–952.
- Sharp-Baker, H., and Chen, R.-H. (2001). Spindle Checkpoint Protein Bub1 Is Required for Kinetochores Localization of Mad1, Mad2, Bub3, and Cenp-E, Independently of Its Kinase Activity. *J. Cell Biol.* *153*, 1239–1250.
- Shepherd, L.A., Meadows, J.C., Sochaj, A.M., Lancaster, T.C., Zou, J., Buttrick, G.J., Rappsilber, J., Hardwick, K.G., and Millar, J.B.A. (2012). Phosphodependent Recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 Kinase Maintains the Spindle Checkpoint. *Curr. Biol.* *22*, 891–899.
- Shi, Y., Solomon, L.R., Pereda-Lopez, A., Giranda, V.L., Luo, Y., Johnson, E.F., Shoemaker, A.R., Levenson, J.,

- and Liu, X. (2011). Ubiquitin-specific Cysteine Protease 2a (USP2a) Regulates the Stability of Aurora-A. *J. Biol. Chem.* *286*, 38960–38968.
- Shim, S.Y., Castro, I.P. de, Neumayer, G., Wang, J., Park, S.K., Sanada, K., and Nguyen, M.D. (2015). Phosphorylation of Targeting Protein for Xenopus Kinesin-like Protein 2 (TPX2) at Threonine 72 in Spindle Assembly. *J. Biol. Chem.* *290*, 9122–9134.
- Shirayama, M., Zachariae, W., Ciosk, R., and Nasmyth, K. (1998). The Polo-like kinase Cdc5p and the WD-repeat protein Cdc20p/fizzy are regulators and substrates of the anaphase promoting complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *17*, 1336–1349.
- Shonn, M.A., McCarroll, R., and Murray, A.W. (2000). Requirement of the Spindle Checkpoint for Proper Chromosome Segregation in Budding Yeast Meiosis. *Science* *289*, 300–303.
- Siegrist, S.E., and Doe, C.Q. (2005). Microtubule-Induced Pins/Gai Cortical Polarity in *Drosophila* Neuroblasts. *Cell* *123*, 1323–1335.
- Silió, V., McAinsh, A.D., and Millar, J.B. (2015). KNL1-Bubs and RZZ Provide Two Separable Pathways for Checkpoint Activation at Human Kinetochores. *Dev. Cell* *35*, 600–613.
- Silk, A.D., Zasadil, L.M., Holland, A.J., Vitre, B., Cleveland, D.W., and Weaver, B.A. (2013). Chromosome missegregation rate predicts whether aneuploidy will promote or suppress tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E4134–E4141.
- Siller, K.H., Cabernard, C., and Doe, C.Q. (2006). The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts. *Nat. Cell Biol.* *8*, 594–600.
- Simonetta, M., Manzoni, R., Mosca, R., Mapelli, M., Massimiliano, L., Vink, M., Novak, B., Musacchio, A., and Ciliberto, A. (2009). The Influence of Catalysis on Mad2 Activation Dynamics. *PLOS Biol* *7*, e1000010.
- Sironi, L. (2001). Mad2 binding to Mad1 and Cdc20, rather than oligomerization, is required for the spindle checkpoint. *EMBO J.* *20*, 6371–6382.
- Sironi, L. (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1-Mad2 core complex: implications of a “safety belt” binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J.* *21*, 2496–2506.
- Skeath, J.B., and Thor, S. (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr. Opin. Neurobiol.* *13*, 8–15.
- Slack, C., Overton, P.M., Tuxworth, R.I., and Chia, W. (2007). Asymmetric localisation of Miranda and its cargo proteins during neuroblast division requires the anaphase-promoting complex/cyclosome. *Development* *134*, 3781–3787.
- Sliedrecht, T., Zhang, C., Shokat, K.M., and Kops, G.J.P.L. (2010). Chemical Genetic Inhibition of Mps1 in Stable Human Cell Lines Reveals Novel Aspects of Mps1 Function in Mitosis. *PLOS ONE* *5*, e10251.
- Smith, C.A., Lau, K.M., Rahmani, Z., Dho, S.E., Brothers, G., She, Y.M., Berry, D.M., Bonneil, E., Thibault, P., Schweisguth, F., et al. (2007). aPKC-mediated phosphorylation regulates asymmetric membrane localization of the cell fate determinant Numb. *EMBO J.* *26*, 468–480.
- Song, Y., and Lu, B. (2011). Regulation of cell growth by Notch signaling and its differential requirement in normal vs. tumor-forming stem cells in *Drosophila*. *Genes Dev.* *25*, 2644–2658.
- Song, S.J., Song, M.S., Kim, S.J., Kim, S.Y., Kwon, S.H., Kim, J.G., Calvisi, D.F., Kang, D., and Lim, D.-S. (2009). Aurora A Regulates Prometaphase Progression by Inhibiting the Ability of RASSF1A to Suppress APC-Cdc20 Activity. *Cancer Res.* *69*, 2314–2323.
- Sotillo, R., Hernando, E., Díaz-Rodríguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., and Benezra, R. (2007). Mad2 Overexpression Promotes Aneuploidy and Tumorigenesis in Mice. *Cancer Cell* *11*, 9–23.
- Sotillo, R., Schwartzman, J.-M., Socci, N.D., and Benezra, R. (2010). Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal. *Nature* *464*, 436–440.
- Sousa-Nunes, R., Chia, W., and Somers, W.G. (2009). Protein Phosphatase 4 mediates localization of the Miranda complex during *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *Genes Dev.* *23*, 359–372.
- Stern, B.M., and Murray, A.W. (2001). Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Curr. Biol.* *11*, 1462–1467.
- Stucke, V.M., Silljé, H.H.W., Arnaud, L., and Nigg, E.A. (2002). Human Mps1 kinase is required for the spindle

- assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J.* *21*, 1723–1732.
- Sudakin, V., Chan, G.K.T., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* *154*, 925–936.
- Sumara, I., Giménez-Abián, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Roles of Polo-like Kinase 1 in the Assembly of Functional Mitotic Spindles. *Curr. Biol.* *14*, 1712–1722.
- Sunkel, C.E., and Glover, D.M. (1988). polo, a mitotic mutant of Drosophila displaying abnormal spindle poles. *J. Cell Sci.* *89*, 25–38.
- Taguchi, S., Honda, K., Sugiura, K., Yamaguchi, A., Furukawa, K., and Urano, T. (2002). Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1. *FEBS Lett.* *519*, 59–65.
- Tambe, M., Pruikkonen, S., Mäki-Jouppila, J., Chen, P., Elgaaen, B.V., Straume, A.H., Huhtinen, K., Cárpen, O., Lønning, P.E., Davidson, B., et al. (2016). Novel Mad2-targeting miR-493-3p controls mitotic fidelity and cancer cells' sensitivity to paclitaxel. *Oncotarget* *7*, 12267–12285.
- Tanaka, M., Ueda, A., Kanamori, H., Ideguchi, H., Yang, J., Kitajima, S., and Ishigatsubo, Y. (2002a). Cell-cycle-dependent Regulation of Human aurora A Transcription Is Mediated by Periodic Repression of E4TF1. *J. Biol. Chem.* *277*, 10719–10726.
- Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J.R., and Nasmyth, K. (2002b). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora Kinase-INCENP) Complex Promotes Chromosome Bi-orientation by Altering Kinetochore-Spindle Pole Connections. *Cell* *108*, 317–329.
- Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B., and Yu, H. (2001). Mad2-Independent Inhibition of APCCdc20 by the Mitotic Checkpoint Protein BubR1. *Dev. Cell* *1*, 227–237.
- Tang, Z., Shu, H., Oncel, D., Chen, S., and Yu, H. (2004). Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 Provides a Catalytic Mechanism for APC/C Inhibition by the Spindle Checkpoint. *Mol. Cell* *16*, 387–397.
- Tauchman, E.C., Boehm, F.J., and DeLuca, J.G. (2015). Stable kinetochore-microtubule attachment is sufficient to silence the spindle assembly checkpoint in human cells. *Nat. Commun.* *6*, 10036.
- Tavernier, N., Noatynska, A., Panbianco, C., Martino, L., Hove, L.V., Schwager, F., Léger, T., Gotta, M., and Pintard, L. (2015). Cdk1 phosphorylates SPAT-1/Bora to trigger PLK-1 activation and drive mitotic entry in *C. elegans* embryos. *J. Cell Biol.* *208*, 661–669.
- Taylor, S.S., Ha, E., and McKeon, F. (1998). The Human Homologue of Bub3 Is Required for Kinetochore Localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related Protein Kinase. *J. Cell Biol.* *142*, 1–11.
- Taylor, S.S., Hussein, D., Wang, Y., Elderkin, S., and Morrow, C.J. (2001). Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *J. Cell Sci.* *114*, 4385–4395.
- Teichner, A., Eytan, E., Sitry-Shevah, D., Miniowitz-Shemtov, S., Dumin, E., Gromis, J., and Hershko, A. (2011). p31 comet promotes disassembly of the mitotic checkpoint complex in an ATP-dependent process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 3187–3192.
- Terada, Y., Uetake, Y., and Kuriyama, R. (2003). Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in Drosophila and mammalian cells. *J. Cell Biol.* *162*, 757–764.
- Thakur, H.C., Singh, M., Nagel-Steger, L., Kremer, J., Prumbaum, D., Fansa, E.K., Ezzahoini, H., Nouri, K., Gremer, L., Abts, A., et al. (2014). The Centrosomal Adaptor TACC3 and the Microtubule Polymerase chTOG Interact via Defined C-terminal Subdomains in an Aurora-A Kinase-independent Manner. *J. Biol. Chem.* *289*, 74–88.
- Thomas, Y., Cirillo, L., Panbianco, C., Martino, L., Tavernier, N., Schwager, F., Van Hove, L., Joly, N., Santamaria, A., Pintard, L., et al. (2016). Cdk1 Phosphorylates SPAT-1/Bora to Promote Plk1 Activation in *C. elegans* and Human Cells. *Cell Rep.* *15*, 510–518.
- Thompson, S.L., and Compton, D.A. (2010). Proliferation of aneuploid human cells is limited by a p53-dependent mechanism. *J. Cell Biol.* *188*, 369–381.
- Toji, S., Yabuta, N., Hosomi, T., Nishihara, S., Kobayashi, T., Suzuki, S., Tamai, K., and Nojima, H. (2004). The centrosomal protein Lats2 is a phosphorylation target of Aurora-A kinase. *Genes Cells* *9*, 383–397.
- Toya, M., Terasawa, M., Nagata, K., Iida, Y., and Sugimoto, A. (2011). A kinase-independent role for Aurora A in the assembly of mitotic spindle microtubules in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat. Cell Biol.* *13*, 708–714.

- Tsai, M.-Y., and Zheng, Y. (2005). Aurora A Kinase-Coated Beads Function as Microtubule-Organizing Centers and Enhance RanGTP-Induced Spindle Assembly. *Curr. Biol.* *15*, 2156–2163.
- Tsai, C.Y., Ngo, B., Tapadia, A., Hsu, P.-H., Wu, G., and Lee, W.-H. (2011). Aurora-A Phosphorylates Augmin Complex Component Hic1 Protein at an N-terminal Serine/Threonine Cluster to Modulate Its Microtubule Binding Activity during Spindle Assembly. *J. Biol. Chem.* *286*, 30097–30106.
- Tsai, M.-Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C., and Zheng, Y. (2003). A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* *5*, 242–248.
- Tsunematsu, T., Arakaki, R., Yamada, A., Ishimaru, N., and Kudo, Y. (2015). The Non-Canonical Role of Aurora-A in DNA Replication. *Front. Oncol.* *5*.
- Udayakumar, T.S., Belakavadi, M., Choi, K.-H., Pandey, P.K., and Fondell, J.D. (2006). Regulation of Aurora-A Kinase Gene Expression via GABP Recruitment of TRAP220/MED1. *J. Biol. Chem.* *281*, 14691–14699.
- Uetake, Y., and Sluder, G. (2010). Prolonged Prometaphase Blocks Daughter Cell Proliferation Despite Normal Completion of Mitosis. *Curr. Biol.* *20*, 1666–1671.
- Uzunova, K., Dye, B.T., Schutz, H., Ladurner, R., Petzold, G., Toyoda, Y., Jarvis, M.A., Brown, N.G., Poser, I., Novatchkova, M., et al. (2012). APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/CMCC and disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1116–1123.
- Vanoosthuyse, V., and Hardwick, K.G. (2009). A Novel Protein Phosphatase 1-Dependent Spindle Checkpoint Silencing Mechanism. *Curr. Biol.* *19*, 1176–1181.
- Varetti, G., Guida, C., Santaguida, S., Chirolì, E., and Musacchio, A. (2011). Homeostatic Control of Mitotic Arrest. *Mol. Cell* *44*, 710–720.
- Varmark, H., Llamazares, S., Rebollo, E., Lange, B., Reina, J., Schwarz, H., and Gonzalez, C. (2007). Asterless Is a Centriolar Protein Required for Centrosome Function and Embryo Development in *Drosophila*. *Curr. Biol.* *17*, 1735–1745.
- Venoux, M., Basbous, J., Berthenet, C., Prigent, C., Fernandez, A., Lamb, N.J., and Rouquier, S. (2008). 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.* *17*, 215–224.
- Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbé, J.-C., Castro, A., and Lorca, T. (2004). Kinetochores Localize of Spindle Checkpoint Proteins: Who Controls Whom? *Mol. Biol. Cell* *15*, 4584–4596.
- Vink, M., Simonetta, M., Transidico, P., Ferrari, K., Mapelli, M., De Antoni, A., Massimiliano, L., Ciliberto, A., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2006). In Vitro FRAP Identifies the Minimal Requirements for Mad2 Kinetochores Dynamics. *Curr. Biol.* *16*, 755–766.
- Vleugel, M., Tromer, E., Omerzu, M., Groenewold, V., Nijenhuis, W., Snel, B., and Kops, G.J.P.L. (2013). Arrayed BUB recruitment modules in the kinetochore scaffold KNL1 promote accurate chromosome segregation. *J. Cell Biol.* *203*, 943–955.
- Vleugel, M., Omerzu, M., Groenewold, V., Hadders, M.A., Lens, S.M.A., and Kops, G.J.P.L. (2015a). Sequential Multisite Phospho-Regulation of KNL1-BUB3 Interfaces at Mitotic Kinetochores. *Mol. Cell* *57*, 824–835.
- Vleugel, M., Hoek, T.A., Tromer, E., Sliedrecht, T., Groenewold, V., Omerzu, M., and Kops, G.J.P.L. (2015b). Dissecting the roles of human BUB1 in the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Sci* *128*, 2975–2982.
- Vogel, C., Kienitz, A., Hofmann, I., Müller, R., and Bastians, H. (2004). Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene* *23*, 6845–6853.
- Walter, A.O., Seghezzi, W., Korver, W., Sheung, J., and Lees, E. (2000). The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene* *19*, 4906–4916.
- Wang, C., Chang, K.C., Somers, G., Virshup, D., Ang, B.T., Tang, C., Yu, F., and Wang, H. (2009). Protein phosphatase 2A regulates self-renewal of *Drosophila* neural stem cells. *Development* *136*, 2287–2296.
- Wang, C., Li, S., Januschke, J., Rossi, F., Izumi, Y., Garcia-Alvarez, G., Gwee, S.S.L., Soon, S.B., Sidhu, H.K., Yu, F., et al. (2011). An Ana2/Ctp/Mud Complex Regulates Spindle Orientation in *Drosophila* Neuroblasts. *Dev. Cell* *21*, 520–533.
- Wang, H., Somers, G.W., Bashirullah, A., Heberlein, U., Yu, F., and Chia, W. (2006). Aurora-A acts as a tumor suppressor and regulates self-renewal of *Drosophila* neuroblasts. *Genes Dev.* *20*, 3453–3463.

- Wang, H., Ouyang, Y., Somers, W.G., Chia, W., and Lu, B. (2007). Polo inhibits progenitor self-renewal and regulates Numb asymmetry by phosphorylating Pon. *Nature* *449*, 96–100.
- Wang, K., Sturt-Gillespie, B., Hittle, J.C., Macdonald, D., Chan, G.K., Yen, T.J., and Liu, S.-T. (2014). Thyroid Hormone Receptor Interacting Protein 13 (TRIP13) AAA-ATPase Is a Novel Mitotic Checkpoint-silencing Protein. *J. Biol. Chem.* *289*, 23928–23937.
- Wang, P., Galan, J.A., Normandin, K., Bonneil, É., Hickson, G.R., Roux, P.P., Thibault, P., and Archambault, V. (2013). Cell cycle regulation of Greatwall kinase nuclear localization facilitates mitotic progression. *J. Cell Biol.* *202*, 277–293.
- Wassmann, K., and Benezra, R. (1998). Mad2 transiently associates with an APC/p55Cdc complex during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 11193–11198.
- Weaver, B.A.A., Silk, A.D., Montagna, C., Verdier-Pinard, P., and Cleveland, D.W. (2007). Aneuploidy Acts Both Oncogenically and as a Tumor Suppressor. *Cancer Cell* *11*, 25–36.
- Weiss, E., and Winey, M. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J. Cell Biol.* *132*, 111–123.
- Weng, M., Golden, K.L., and Lee, C.-Y. (2010). dFzef/Earmuff Maintains the Restricted Developmental Potential of Intermediate Neural Progenitors in *Drosophila*. *Dev. Cell* *18*, 126–135.
- Windecker, H., Langegger, M., Heinrich, S., and Hauf, S. (2009). Bub1 and Bub3 promote the conversion from monopolar to bipolar chromosome attachment independently of shugoshin. *EMBO Rep.* *10*, 1022–1028.
- Wirtz-Peitz, F., Nishimura, T., and Knoblich, J.A. (2008). Linking Cell Cycle to Asymmetric Division: Aurora-A Phosphorylates the Par Complex to Regulate Numb Localization. *Cell* *135*, 161–173.
- Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E., and Vernos, I. (2000). Tpx2, a Novel *Xenopus* Map Involved in Spindle Pole Organization. *J. Cell Biol.* *149*, 1405–1418.
- Wodarz, A., and Näthke, I. (2007). Cell polarity in development and cancer. *Nat. Cell Biol.* *9*, 1016–1024.
- Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., and Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* *402*, 544–547.
- Wojcik, E., Basto, R., Serr, M., Scaërou, F., Karess, R., and Hays, T. (2001). Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein. *Nat. Cell Biol.* *3*, 1001–1007.
- Wong, O.K., and Fang, G. (2007). Cdk1 phosphorylation of BubR1 controls spindle checkpoint arrest and Plk1-mediated formation of the 3F3/2 epitope. *J. Cell Biol.* *179*, 611–617.
- Wong, J., Lerrigo, R., Jang, C.-Y., and Fang, G. (2008). Aurora A Regulates the Activity of HURP by Controlling the Accessibility of Its Microtubule-binding Domain. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2083–2091.
- Wu, C.-C., Yang, T.-Y., Yu, C.-T.R., Phan, L., Ivan, C., Sood, A.K., Hsu, S.-L., and Lee, M.-H. (2012). p53 negatively regulates Aurora A via both transcriptional and posttranslational regulation. *Cell Cycle* *11*, 3433–3442.
- Wurzenberger, C., and Gerlich, D.W. (2011). Phosphatases: providing safe passage through mitotic exit. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 469–482.
- Wysong, D.R., Chakravarty, A., Hoar, K., and Ecsedy, J.A. (2009). The inhibition of Aurora A abrogates the mitotic delay induced by microtubule perturbing agents. *Cell Cycle* *8*, 876–888.
- Xia, G., Luo, X., Habu, T., Rizo, J., Matsumoto, T., and Yu, H. (2004). Conformation-specific binding of p31comet antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *EMBO J.* *23*, 3133–3143.
- Xiao, Q., Komori, H., and Lee, C.-Y. (2012). klumpfuss distinguishes stem cells from progenitor cells during asymmetric neuroblast division. *Development* *139*, 2670–2680.
- Xie, Y., Li, X., Zhang, X., Mei, S., Li, H., Urso, A., and Zhu, S. (2014). The *Drosophila* Sp8 transcription factor Buttonhead prevents premature differentiation of intermediate neural progenitors. *eLife* *3*, e03596.
- Yabuta, N., Mukai, S., Okada, N., Aylon, Y., and Nojima, H. (2011). The tumor suppressor Lats2 is pivotal in Aurora A and Aurora B signaling during mitosis. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 2724–2736.
- Yamagishi, Y., Yang, C.-H., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2012). MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat. Cell Biol.* *14*, 746–752.

- Yamaguchi, M., Yu, S., Qiao, R., Weissmann, F., Miller, D.J., VanderLinden, R., Brown, N.G., Frye, J.J., Peters, J.-M., and Schulman, B.A. (2015). Structure of an APC3–APC16 Complex: Insights into Assembly of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome. *J. Mol. Biol.* *427*, 1748–1764.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Iwamatsu, A., Shinohara, A., and Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl Forms a Protein Complex with PAR-6 and aPKC Independently of PAR-3 to Regulate Epithelial Cell Polarity. *Curr. Biol.* *13*, 734–743.
- Yamashita, Y.M., Mahowald, A.P., Perlin, J.R., and Fuller, M.T. (2007). Asymmetric Inheritance of Mother Versus Daughter Centrosome in Stem Cell Division. *Science* *315*, 518–521.
- Ye, A.A., Deretic, J., Hoel, C.M., Hinman, A.W., Cimini, D., Welburn, J.P., and Maresca, T.J. (2015a). Aurora A Kinase Contributes to a Pole-Based Error Correction Pathway. *Curr. Biol.* *25*, 1842–1851.
- Ye, Q., Rosenberg, S.C., Moeller, A., Speir, J.A., Su, T.Y., and Corbett, K.D. (2015b). TRIP13 is a protein-remodeling AAA+ ATPase that catalyzes MAD2 conformation switching. *eLife* *4*, e07367.
- Yin, N., Shi, J., Wang, D., Tong, T., Wang, M., Fan, F., and Zhan, Q. (2012). IQGAP1 interacts with Aurora-A and enhances its stability and its role in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *421*, 64–69.
- Yu, F., Morin, X., Cai, Y., Yang, X., and Chia, W. (2000). Analysis of partner of inscuteable, a Novel Player of *Drosophila* Asymmetric Divisions, Reveals Two Distinct Steps in Inscuteable Apical Localization. *Cell* *100*, 399–409.
- Yu, X., Minter-Dykhouse, K., Malureanu, L., Zhao, W.-M., Zhang, D., Merkle, C.J., Ward, I.M., Saya, H., Fang, G., van Deursen, J., et al. (2005). Chfr is required for tumor suppression and Aurora A regulation. *Nat. Genet.* *37*, 401–406.
- Zacharioudaki, E., Magadi, S.S., and Delidakis, C. (2012). bHLH-O proteins are crucial for *Drosophila* neuroblast self-renewal and mediate Notch-induced overproliferation. *Development* *139*, 1258–1269.
- Zacharioudaki, E., Housden, B.E., Garinis, G., Stojnic, R., Delidakis, C., and Bray, S.J. (2016). Genes implicated in stem cell identity and temporal programme are directly targeted by Notch in neuroblast tumours. *Development* *143*, 219–231.
- Zeng, K., Bastos, R.N., Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2010). Protein phosphatase 6 regulates mitotic spindle formation by controlling the T-loop phosphorylation state of Aurora A bound to its activator TPX2. *J. Cell Biol.* *191*, 1315–1332.
- Zhang, F., Huang, Z.-X., Bao, H., Cong, F., Wang, H., Chai, P.C., Xi, Y., Ge, W., Somers, W.G., Yang, Y., et al. (2016a). Phosphotyrosyl phosphatase activator facilitates localization of Miranda through dephosphorylation in dividing neuroblasts. *Development* *143*, 35–44.
- Zhang, G., Lischetti, T., and Nilsson, J. (2014). A minimal number of MELT repeats supports all the functions of KNL1 in chromosome segregation. *J Cell Sci* *127*, 871–884.
- Zhang, G., Lischetti, T., Hayward, D.G., and Nilsson, J. (2015). Distinct domains in Bub1 localize RZZ and BubR1 to kinetochores to regulate the checkpoint. *Nat. Commun.* *6*, 7162.
- Zhang, S., Chang, L., Alfieri, C., Zhang, Z., Yang, J., Maslen, S., Skehel, M., and Barford, D. (2016b). Molecular mechanism of APC/C activation by mitotic phosphorylation. *Nature* *533*, 260–264.
- Zhang, X., Ems-McClung, S.C., and Walczak, C.E. (2008). Aurora A Phosphorylates MCAK to Control Ran-dependent Spindle Bipolarity. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2752–2765.
- Zhang, Y., Ni, J., Huang, Q., Ren, W., Yu, L., and Zhao, S. (2007). Identification of the auto-inhibitory domains of Aurora-A kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *357*, 347–352.
- Zhao, Z., Lim, J.P., Ng, Y.-W., Lim, L., and Manser, E. (2005). The GIT-Associated Kinase PAK Targets to the Centrosome and Regulates Aurora-A. *Mol. Cell* *20*, 237–249.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W., Gray, J., Sahin, A., Brinkley, B., and Sen, S. (1998). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat. Genet.* *20*, 189–193.
- Zhu, S., Barshow, S., Wildonger, J., Jan, L.Y., and Jan, Y.-N. (2011). Ets transcription factor Pointed promotes the generation of intermediate neural progenitors in *Drosophila* larval brains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 20615–20620.
- Zhu, T., Dou, Z., Qin, B., Jin, C., Wang, X., Xu, L., Wang, Z., Zhu, L., Liu, F., Gao, X., et al. (2013).

Phosphorylation of Microtubule-binding Protein Hec1 by Mitotic Kinase Aurora B Specifies Spindle Checkpoint Kinase Mps1 Signaling at the Kinetochore. *J. Biol. Chem.* 288, 36149–36159.

Zorba, A., Buosi, V., Kutter, S., Kern, N., Pontiggia, F., Cho, Y.-J., and Kern, D. (2014). Molecular mechanism of Aurora A kinase autophosphorylation and its allosteric activation by TPX2. *eLife* 3.

ANNEXE 2

VU :

VU :

Le Directeur de Thèse
(Nom et Prénom)

Le Responsable de l'École Doctorale

VU pour autorisation de soutenance

Rennes, le

Le Président de l'Université de Rennes 1

David ALIS

VU après soutenance pour autorisation de publication :

Le Président de Jury,
(Nom et Prénom)

Résumé

Une surprolifération cellulaire associée à de l'aneuploïdie est un marqueur couramment retrouvé dans les cancers et une faible instabilité génétique peut-être un élément aggravant (sinon déclencheur) de la tumorigénèse (Duijf and Benezra, 2013). Récemment, il a été montré sur un modèle de cellules cancéreuses en culture qu'une forte aneuploïdie compromet la prolifération cellulaire en entraînant la mort de ces dernières. Au cours de ma thèse, nous avons souhaité tester si cette hypothèse se vérifiait *in vivo* en utilisant comme modèle, les tumeurs du système nerveux central de la larve de *D. melanogaster*. Nous avons fait le choix d'utiliser des mutants pour des gènes impliqués dans la formation du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes (*Sas-4* ou *AurA*) afin d'induire ces tumeurs. Pour générer l'aneuploïdie, nous avons choisi d'associer les mutations *sas-4* ou *aurA* avec des mutations pour des gènes essentiels du SAC, *Mad2* ou *BubR1^{ken}*. Nous avons ensuite analysé par immunofluorescence et microscopie l'effet de la perte du SAC sur la prolifération des Nb.

Pour *sas-4*, la perte du SAC cause l'apparition d'une forte aneuploïdie et une baisse du nombre de Nb associée à une forte réduction de taille des cerveaux. Cela compromet totalement la capacité des cerveaux mutants à induire des tumeurs lorsqu'on les injecte dans l'abdomen de mouches adultes saines. Dans le cas d'*aurA*, ni hausse de l'aneuploïdie dans le tissu ni baisse de la prolifération des Nbs n'ont été observés. Par ailleurs, la même forte proportion de mouches injectées avec des cerveaux *aurA* ou *aurA mad2* développant une tumeur a été constaté. Afin de mieux comprendre pourquoi le mutant *aurA* ne réagit pas comme le mutant *sas-4* à la déplétion du SAC, nous avons entrepris une analyse détaillée des mutants *aurA* et *aurA mad2*. Nous avons d'abord observé que, malgré la perte du SAC, 1) il existe toujours un délai en mitose dans *aurA mad2* et 2) il existe un délai entre la satisfaction du SAC et l'entrée en anaphase dans *aurA*. Comme l'entrée en anaphase est dépendante de la dégradation de la CycB et de la Sécurine *via* l'APC/C, nous avons analysé le comportement de la CycB (couplé à une étiquette GFP) par vidéo-microscopie en temps réel et observé un défaut de la régulation de la dégradation de cette dernière dans le mutant *aurA* ainsi que dans le double mutant *aurA mad2*. Ces observations nous ont permis de proposer un nouveau rôle pour la kinase *AurA* dans la régulation de la dégradation de la CycB en fin de mitose.