



HAL
open science

La transmission du signal de la cohésion au centromère du chromosome métaphasique

François Moyroud

► **To cite this version:**

François Moyroud. La transmission du signal de la cohésion au centromère du chromosome métaphasique. Biotechnologies. 2011. dumas-01132643

HAL Id: dumas-01132643

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01132643>

Submitted on 17 Mar 2015

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.

CONSERVATOIRE NATIONAL DES ARTS ET METIERS

**CENTRE REGIONAL ASSOCIE
DE RENNES**

MEMOIRE

Présenté en vue d'obtenir le diplôme d'ingénieur en sciences
et technique du vivant, option : génie biologique

Soutenu le 10 juin 2011

Par :

Moyroud François-Xavier

**LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DE LA COHESION
AU CENTROMERE DU CHROMOSOME
METAPHASIQUE**

JURY

Président :

Dr Fabien Magne (CNAM Paris)

Membre :

Dr Jean-Marc Fraslin (Maître de conférence agrocampus-ouest-CNAM
Bretagne, tuteur)

Dr Christian Jaulin (Directeur de recherche Inserm, UMR 6061 Rennes, maître
de stage)

Dr Vincent Legagneux (Chargé de recherche CNRS, UMR 6061 Rennes)

Dr Nicolas Mouchet (Chercheur associé, UMR 6061 Rennes, ingénieur CNAM)

Pour Hugo et Typhaine
En espérant que dans quelques années, le travail relaté
dans ce mémoire ne leur semblera être qu'une simple banalité.

*« Seul un adulte peut avoir l'idée sordide de monnayer ses rêves
d'enfant. » Michel Greg*

Remerciements

S et KOH

Soufre et Potasse, telle est la devise du Conservatoire National des Arts et Métiers. Durant ces dernières années, j'ai en effet pas mal potassé, mais grâce à toutes les personnes qui m'ont accompagné, je n'ai pas réellement souffert. Je tiens, en ces quelques lignes, à leurs adresser sincèrement toute ma gratitude.

En premier lieu, je remercie Jean-Marc Fraslin responsable de l'antenne du CNAM d'AGROCAMPUS OUEST. En plus de ses activités d'enseignant chercheur au sein de l'« Agro de Rennes », il soutient à bout de bras l'enseignement de la biologie au CNAM en Bretagne. La qualité de ses enseignements est légendaire, d'une part grâce à ses qualités pédagogiques, d'autre part grâce à la justesse de sa perception des contraintes qu'imposent vie professionnelle et reprise des études. M.Fraslin a toujours été présent lorsque je le sollicitais et a su faire preuve de patience devant les délais que je n'ai pas toujours (jamais ?) respectés. Si je peux aujourd'hui présenter ce mémoire, c'est avant tout grâce à lui.

Dans un second temps, je remercie Christian et Laura Jaulin de m'avoir accueilli dans leur équipe. En partageant avec moi votre enthousiasme scientifique, vous m'avez fait passer neuf mois formidables. Avec patience, vous avez réussi à m'inculquer les rudiments de la démarche scientifique et je reprends maintenant souvent à mon compte cette question que Laura m'a si souvent posée : "Quelle est la question que tu te poses ?"

La question que je me pose en rédigeant ces lignes est : "Comment puis-je, en quelques mots seulement, témoigner de la reconnaissance que j'ai envers vous ?" Vous m'avez tant appris sur les plans théorique et pratique. J'ai, grâce à vous, eu le stage le plus formateur qu'il puisse être.

Outre votre maîtrise professionnelle, tout au long de ces neuf mois, je n'ai eu de cesse d'être impressionné par vos qualités humaines et votre culture encyclopédique. J'ai réellement passé un excellent moment en votre compagnie, au labo et en dehors.

Une autre membre de l'équipe à qui je dois beaucoup est Rozenn Gallais, son amour de la science bien faite va certainement devenir légendaire. Son dévouement pour aider les étudiants est époustouflant. La justesse et la pertinence de ses raisonnements m'ont souvent sorti d'impasse.

Avec Rozenn, Laura et Christian comme maîtres, je dois bien avouer que j'ai bien souvent eu du mal à suivre les réunions de brainstorming. Mais ils ont toujours fini par me faire comprendre ce qu'il se passait devant mes yeux. Merci à vous trois.

Je tiens à remercier Claude Prigent, directeur de l'UMR 6061, de m'avoir ouvert les portes de son unité. L'ensemble des personnels de l'unité qu'il dirige a toujours su me donner un coup de main ou une explication lorsque j'en ressentais le besoin. Cela a notamment été le cas de Françoise Vignaux en pièce de culture et Stéphanie Dutertre au microscope.

Au cours de ce stage, j'ai découvert le monde de la recherche. Vincent Legagneux et Erwan Watrin en présentant leurs travaux au cours des réunions du « club cohésion » m'ont fait comprendre que la recherche était aussi un monde de passionné. Je les en remercie.

Marie-Emmanuelle Blanchard, en charge du volet administratif de l'antenne du CNAM d'AGROCAMPUS OUEST et Valérie Depont de centre de Rennes, m'ont apporté une grande aide dans le suivie de mon cursus. Leurs nombreux courriels me tenant informé des démarches à entreprendre et des délais à respecter m'ont été très utiles.

Je n'oublie pas non plus Nicolas Mouchet, qui a été l'initiateur de ce stage en me permettant de rencontre Chistian Jaulin et qui sera présent à la conclusion de ce travail en ayant accepter d'être membre de mon jury.

Je remercie aussi le Professeur Luc Paillard et le Professeur Henri Wroblésky de m'avoir permis de suivre les unités d'enseignement du Master SCMV dont ils sont les responsables.

Enfin, je remercie mon épouse Sandrine, mes parents, mon frère et ma sœur de m'avoir supporté (dans toutes les acceptions du terme) tout au long de ces années passées à préparer ce diplôme d'ingénieur. Sans leur soutien, je n'y serais certainement pas parvenu.

TABLE DES ABBREVIATIONS

ac : acétylé
ADN : acide désoxyribonucléique
APC/C : anaphase promoting complex/cyclosome
ARN : acide ribonucléique
ATM : ataxia-telangiectasia-mutated
ATP : adénosine tri phosphate
ATR : ataxia-telangiectasia- and Rad3-related
BUB1 : budding uninhibited by benzimidazoles 1
BUB3 : budding uninhibited by benzimidazoles 3
BUBR1 : budding uninhibited by benzimidazoles related 1
CAK : CDK activating kinase
CAP : chromosom associated protein
CDC 25 : cell division control protein 25
CDC 20 : cell division control protein 20
CDK : cyclin dependant kinase
CENP A : centromeric protein A
CHK 1 : checkpoint kinase 1
CHK 2 : checkpoint kinase 2
CPC : chromosom passenger complex
CREST: Calcifications sous cutanés, syndrome de Reynaud, anomalies oEsophagiennes, Sclérodactylie, Télangiectasies
dm : diméthylé
Dapi : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
DNMT : DNA méthyle transférase
DSB : double strand break
E2F : E2 transcription factor
ECO1 : establishment of cohesion protein 1
GDP : guanosine di phosphate
GTP : guanosine tri phosphate
H : histidine
H3 : histone H3
HDAC 3 : histone deacetylase 3
KAC: kinetochore attachment checkpoint
K : lysine
MAP : microtubule associated protein
MAD 2: mitotic arrest deficient 2-like protein 1
MCC : mitotic checkpoint complex
miARN : microARN
MPF : mitosis promoting factor
MTOC : microtububule organisation center
ph : phosphorylé
PCM : pericentriolar material
PLK1 : polo like kinase 1
PSCS : precocious sister chromatid separation
R : arginine
RISC : miRNA-induced silencing complex
S : sérine
SCC : sister chromatid cohesion protein

SGO 1 : Shugoshin 1
siARN : small interferent ARN
SMC : structural maintenance of chromosom
T : thréonine
TPX2 : targeting Protein for Xklp2
WAPL : wing apart like protein
WT : wild type

RESUME

Abstract

Cohesin complex maintains cohesion along chromosomes' arms and at centromere during the first stage of prophase. The phosphorylation of cohesin subunit SCC2 by Plk1 and Aurora B leads to a loss of cohesion on chromosomes' arms during the prophase pathway. At centromere, some proteins protect cohesin complex of this pathway until the metaphase. The aim of the project described in this report is to define the transduction of cohesion signal at centromere on the metaphase chromosome. In this study, we used siRNA knockdown on proteins of interest and we shown the impact of this depletion using immunofluorescence on the other proteins of interest. We also see the involvement of CENP A (a centromere specific variant of histone H3) serine 7 phosphorylation by Aurora A and Aurora B in the support of cohesion at centromere. We first identified the centromeric localization of Aurora A by immunofluorescence and, in a second time, we used CENP A Serine7 mutated to alanine cells lines and observed a loss of cohesion. At the end of the study we can certainly give the first steps of the pathway. First, HDAC3 allows BUB1 targeting at centromere. BUB1 initiates two ways: the first one, involving Aurora A and CENP A S7 phosphorylation leads to Aurora B localization at centromere. The second way leads to Shugoshin 1 localization at centromere. The relationship between Aurora B, Shugoshin 1 and Haspin was not clearly identified at the end of this internship.

Keyes words: mitosis, chromosome, chromatids, cohesion, centromere, HDAC3, BUB1, Aurora A, CENP A, Shugoshin, Aurora B, Haspin

Résumé

Au début de la prophase, la cohésion entre chromatides est assurée sur toute la longueur du chromosome par le complexe cohésine. La phosphorylation de la sous unité SCC 2 du complexe cohésine par Plk1 et Aurora B conduit à la perte de la cohésion au cours de la voie de la prophase. Au centromère, la cohésion est protégée jusqu'en métaphase. Le sujet ce mémoire est de définir la voie de transduction du signal de la cohésion au centromère du chromosome métaphasique. Dans cette étude, nous avons, par interférence ARN, déplété des protéines candidates et étudié l'impact de ces déplétion sur les autres protéines du modèle. En parallèle, nous avons montré l'implication de la phosphorylation de la sérine 7 de CENP A (un variant centromérique de l'histone H 3) par Aurora A et Aurora B dans le maintien de la cohésion. Pour ce faire nous avons dans un premier temps montré la localisation centromérique d'Aurora A puis utilisé des lignées cellulaires mutantes dans lesquelles la sérine 7 de CENP A était substituée en alanine. A l'issue des expériences effectuées, nous avons dégagé les premières phases de la voie étudiée. HDAC 3 permet la localisation de BUB1 au centromère. BUB1 initie deux voies : la première, via Aurora A et la phosphorylation de CENP A S7 conduit à localiser Aurora B au centromère. La seconde conduit à localiser la Shugoshine 1 au centromère. A l'issue du stage, les relations entre Aurora B, la Shugoshine 1 et l'Haspine n'ont pas été clairement identifiées.

Mots clés : mitose, chromosome, chromatides, cohésion, HDAC3, BUB1, Aurora A, CENP A, Aurora B, Shugoshin, Haspin

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES ABBREVIATIONS	5
RESUME	7
INTRODUCTION	13
I. Le cycle cellulaire	14
1. Description des différentes phases du cycle cellulaire	14
2. La régulation du cycle cellulaire	16
a. Les complexes kinases dépendantes des cyclines	16
b. Fonction des complexes CDK/Cycline	17
d. Point de contrôle de la mitose	19
3. La mitose	19
a. Les différentes phases de la mitose	20
b. Le chromosome et le fuseau mitotique	21
i. Le chromosome mitotique	21
ii. Le centrosome et le fuseau mitotique	24
c. Le point de contrôle de la mitose	27
II La notion d'épigénétique	29
1. Définition et exemple	29
a. Des exceptions aux lois de Mendel sont liées à des phénomènes épigénétiques	29
i. Les paramutations	29
ii. L'empreinte génomique parentale	29
iii. La variégation par effet de position	30
b. La notion d'épigénétique	30
2. Mécanismes de la régulation épigénétique	30
a. Méthylation de l'ADN	30
b. Les micros ARN	31
c. Les modifications d'histones	31
d. La notion de code histone	32
3. Les marques spécifiques de la mitose	33
a. Phosphorylation de H3S10	33
b. Phosphorylation de H3T3.	34
c. Diméthylation de H3K4	35
d. Phosphorylation de CENP-AS7	36
e. Autres modifications d'histones retrouvées en mitose	36
La cohésion entre chromatides sœurs	37
1. Le complexe cohésine	37
a. La famille des protéines SMC	37
b. Les sous unité non SMC	38
i. SCC1	38
ii. SCC3	38
iii. Structure du coeur du complexe	38
c. Les protéines transitoirement associées aux cohésines	39
d. Fonctions du complexe cohésine	39
i. Fonction de maintien de la cohésion entre chromatides sœurs	39
ii. Autres fonctions	40
4. Etablissement et maintien de la cohésion	40
a. Etablissement de la cohésion	40
i. Modèle à un seul anneau	40
ii. Modèle en menottes	40

b.	Maintien de la cohésion	41
5.	Séparation séquentielle des chromatides sœurs	41
a.	La voie de la prophase	41
b.	La voie de l'anaphase	42
IV.	Elaboration du modèle de transduction du signal de la cohésion au centromère	42
1.	Protéines retenue dans ce modèle	43
a.	HDAC3	43
b.	BUB1	43
c.	Shugoshin	43
d.	Aurora A	43
e.	CENP A	43
f.	Aurora B	43
g.	Haspin	44
2.	Synthèse des connaissances actuelles et élaboration du modèle expérimental	44
3.	Méthodologie de l'étude	45
MATERIELS ET METHODES		47
I. Culture cellulaire		47
1.	Lignée cellulaire	47
2.	Culture et entretien	47
3.	Isolement de clones WT et S7	47
4.	Transfection de siRNA	48
II Western Blot		48
1.	Lyse et extraction protéique	48
2.	Composition des gels de polyacrylamide	48
3.	Electrophorèse	49
4.	Transfert sur membrane de nitrocellulose	49
5.	Révélation	49
III. Immunofluorescence		52
1.	Récolte de cellules	52
2.	Choc hypotonique et cyto centrifugation	52
3.	Fixation et perméabilisation des membranes	53
4.	Immunomarquage	53
IV. Microscopie en épifluorescence		53
1.	Matériel	53
2.	Méthode	54
V. Financement		54
1.	Coût marginal	54
3.	Coût complet	54
4.	Financement du stage	55
a.	financement du projet	55
b.	Revenu du stagiaire	55
Résultats		56
I. Déplétion de HDAC 3		56
1.	Aspect général	56
2.	Indice mitotique et PSCS	56
3.	Données d'immunofluorescence	57
a.	Marquage H3S10ph	57
b.	Marquage H3K4dm	57
c.	Marquage BUB1	57
d.	Marquage Shugoshin1	58

e.	Marquage Aurora A	59
f.	Marquage CENP A S7ph	60
g.	Marquage Aurora B	60
h.	Marquage H3T3ph	61
II.	Déplétion de BUB1	61
1.	Aspect général	61
2.	Indice mitotique et PSCS	62
3.	Données d'immunofluorescence	62
a.	Marquage H3S10ph	62
b.	Marquage H3K4dm	63
c.	Marquage BUB1	64
d.	Marquage Shugoshin1	64
e.	Marquage Aurora A	64
f.	Marquage CenpAS7ph	65
g.	Marquage Aurora B	66
h.	Marquage H3T3ph	66
III.	Déplétion de la Shugoshin 1	66
1.	Aspect général	66
2.	Indice mitotique et PSCS	67
3.	Donnée de l'immunofluorescence	67
a.	H3S10ph	67
b.	H3K4dm	68
c.	BUB1	68
d.	Shugoshin 1	69
e.	Aurora A	69
f.	CENP A S7ph	70
g.	Aurora B	71
h.	H3T3ph	71
IV	Déplétion d'Aurora A	72
1.	Aspect général	72
2.	Indice mitotique et PSCS	72
3.	Données de l'immunofluorescence	72
a.	Marquage H3S10ph	72
b.	Marquage H3K4dm	73
c.	Marquage BUB1	73
d.	Marquage Shugoshin 1	74
e.	Marquage Aurora A	75
f.	Marquage CENP A S7ph	75
g.	Marquage Aurora B	76
h.	Marquage H3T3ph	76
V.	Mutant HA-CENP A S7	77
1.	Aspect général	77
2.	Sélection de nouveau clones	78
3.	Indice mitotique et PSCS	79
4.	Données des immunomarquages lors de la déplétion du CENP A endogène sur les lignées.	79
a.	Marquage H3S10ph	79
b.	Marquage H3K4dm	80
c.	Marquage BUB1	80
d.	Marquage Shugoshin 1	81
e.	Marquage Aurora A	81
f.	Marquage Aurora B	82
g.	Marquage H3T3ph	82
VI.	Déplétion Aurora B	83
1.	Aspect général	83
2.	Indice mitotique et PSCS	84

3.	Données des immunomarquages	84
a.	Marquage H3S10ph	84
b.	Marquage H3K4dm	85
c.	Marquage BUB1	85
d.	Marquage Shugoshin 1	85
e.	Marquage Aurora A	86
f.	Marquage CENP A S7ph	86
g.	Marquage Aurora B	87
h.	Marquage H3T3ph	87
VII Déplétion de l'Haspin		88
1.	Aspect général	88
2.	Indice mitotique et PSCS	88
3.	Données des immunomarquages	89
a.	Marquage H3S10ph	89
b.	Marquage H3K4dm	89
c.	Marquage BUB1	90
d.	Marquage Shugoshin 1	90
e.	Marquage Aurora A	90
f.	Marquage CENP A S7ph	91
g.	Marquage Aurora B	92
h.	Marquage H3T3ph	92
VIII. Résumé des résultats.		93
1.	Déplétion HDAC3	93
2.	Déplétion BUB1	94
3.	Déplétion Shugoshin 1	94
4.	Déplétion Aurora A	95
5.	Déplétion CENP A sur les lignées HA-CENP A WT/S7A	95
6.	Déplétion Aurora B	95
7.	Déplétion Haspin	96
DISCUSSION		97
I. Difficultés techniques		97
1.	Dérive de la lignée témoin et extinction du CENP A endogène	97
a.	Dérive de la lignée HA-CENP A WT	97
b.	Extinction du CENP A endogène	97
2.	Marquage Aurora A	98
3.	Marquage CENP A S7ph	99
II. Validité du modèle proposé		99
1.	La diméthylation de la lysine 4 de H3 est un élément précoce	99
2.	BUB 1 est une protéine centrale de la gestion de la cohésion sur l'ensemble du chromosome	100
3.	La Shugoshin 1 et Aurora A sont indépendantes	100
4.	Comment expliquer la perte de cohésion dans la déplétion d'Aurora A ?	101
a.	La délocalisation de l'Haspin ?	101
b.	Une fuite de la Shugoshin ?	101
c.	la tension au centromère ?	101
5.	Rôle de la phosphorylation de CENP A S7	103
6.	Tout ce qui touche à la cohésion touche Aurora B !	103
7.	Haspin toujours coupable, ou souvent victime ?	104
III. Conclusion		105
1.	Des protéines mobiles et des protéines exclusivement centromérique	105
2.	Que peut-on déduire de façon certaine des manipulations réalisées	105
3.	Quel nouveau modèle peut-on proposer et tester.	106
4.	Une séquence de réaction mais pas une chronologie...	108

PERSPECTIVES	109
I. Définir les acteurs des modifications post-traductionnelles connues :	109
II. Mette en évidence de nouvelles modifications d’histones	109
III. Mieux connaître la fonction d’Aurora b et de Cenp AS7 phosphorylé.	110
REFERENCES	111
LISTE DES FIGURES	115
LISTE DES TABLEAUX	118

Introduction

La mitose est une fenêtre de tir privilégié dans le traitement du cancer. En effet, les cellules tumorales se divisent plus fréquemment que les cellules normales. Statistiquement, la cellule maligne a donc plus de risque qu'une cellule normale de se trouver en mitose lors du traitement. En ciblant la division cellulaire, on peut espérer limiter la toxicité du traitement. Par exemple, certains protocoles de traitement visent à toucher le fuseau mitotique, c'est notamment le cas pour des molécules comme la vinblastine, la vincristine, le nocodazole et le taxol. Ces quatre molécules en stabilisant ou en déstabilisant le fuseau empêchent la migration des chromatides vers les pôles de la cellule en division, la cellule reste alors bloquée en mitose et meurt. Une autre stratégie thérapeutique envisageable serait de provoquer précocement, ou à l'inverse d'empêcher, la séparation des chromatides soeurs. Il a en effet été montré que des anomalies dans la gestion de la cohésion des chromatides au cours de la mitose conduisent à un nombre de chromosome anormal dans les deux cellules filles (Barber *et al.*, 2008). Cet événement autrement appelé aneuploïdie est généralement létal pour les cellules qui en souffrent.

Les mécanismes de régulation du maintien de la cohésion entre les chromatides soeurs sont relativement méconnus à l'heure actuelle. Quelques protéines ont été identifiées comme ayant un rôle dans cette fonction biologique : certaines n'ont pas d'activité enzymatique, d'autres en présente une. Plus particulièrement, certaines protéines ont pour substrat les queues N terminales des protéines histones. Les histones sont des protéines formant des complexes sur lesquels s'enroule la molécule d'ADN. Les histones subissent de nombreuses modifications post traductionnelles, celles-ci sont réputées intervenir dans la fonction de transcription et sont à l'origine du « code histone de la transcription ». L'identification de modification post traductionnelle d'histone spécifique de la mitose laisse supposer l'existence d'un « code histone de la mitose ». C'est sur cette hypothèse que c'est développée la problématique d'étude de l'équipe "Epigénétique et Cancer" dirigée par Christian Jaulin. Plus précisément, l'équipe s'intéresse aux modifications des histones dans une région particulière du chromosome mitotique : le centromère. C'est au niveau de cette région que subsistent les derniers points de cohésion avant la séparation des chromatides soeurs. Actuellement, au sein de cette équipe, plusieurs projets sont en cours : l'un d'entre eux vise à mettre en évidence une voie de transduction du signal de la cohésion au centromère des chromosomes métaphasique. C'est ce sujet qui sera présenté dans ce mémoire.

Afin de pouvoir présenter les protéines candidates à intégrer le modèle testé au cours du stage effectué dans cette équipe, l'introduction de ce document présentera dans sa première partie le cycle cellulaire en se focalisant plus particulièrement sur le déroulement de la mitose. Dans une seconde partie, la notion d'épigénétique sera présentée dans sa globalité, les hypothèses conduisant au concept de code histone de la mitose y seront développées. Enfin, dans un dernier temps, la fonction de cohésion entre chromatides sœurs sera décrite. En conclusion de cette introduction, une synthèse en reliant les données de l'étude de la cohésion aux modifications post traductionnelles des histones permettra de développer le modèle de transduction du signal de la cohésion testé au cours du stage.

Ce mémoire se poursuivra par une présentation des procédures expérimentales suivies pour vérifier la validité du modèle. Les explications théoriques des techniques employées seront fournies en annexe. Les résultats obtenus seront ensuite décrits et discutés afin de pouvoir dégager de nouvelles perspectives.

I. Le cycle cellulaire

La capacité de prolifération d'une cellule vivante est liée à son aptitude à dupliquer les structures qui la compose. Chez les eucaryotes, la régulation de la prolifération peut être représentée sous la forme d'un cycle. Les différentes phases de ce cycle ainsi que les modes de régulation du passage de l'une à l'autre vont être décrites dans cette première partie.

1. Description des différentes phases du cycle cellulaire

Les phases du cycle cellulaire ont été définies par l'observation des modifications métabolique de la cellule. Notamment les travaux d'Howard et Pelc (Howard, 1953) par l'utilisation des technique d'autohistoradiographie ont permis de montrer que la réplication de l'ADN ne se déroulait pas au cours de la mitose. Ils montrent que cette synthèse a lieu durant une période limitée de l'interphase (intervalle de temps séparant deux mitoses). Cette observation a permis de dégager quatre phases : une phase d'intervalle (*gap* en anglais) G1 suivant la mitose, une phase de synthèse de l'ADN ou phase S, Une seconde phase d'intervalle, G2 et enfin la mitose (M) (Figure 1).

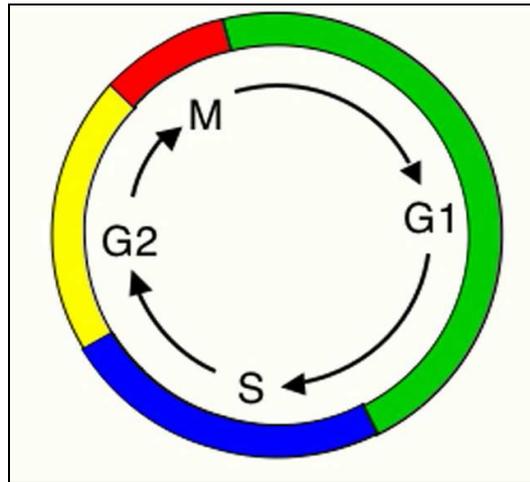


Figure 1 : Représentation du cycle cellulaire présentant l'enchaînement des quatre phases du cycle (Van den Heuvel, 2005)

La phase G1 est la phase dont la durée est la plus variable, elle est inexistante au cours des premières divisions embryonnaires et peut atteindre plusieurs mois. La majorité des cellules qui composent un organisme sont présentes sous cette phase. Les cellules différenciées qui ne se divisent plus restent dans un état analogue à celui de la phase G1 que l'on nomme phase quiescente, ou G0 (Alberts *et al.*, 1989).

En G1, la cellule est transcriptionnellement active et l'ADN chromosomique est présent sous la forme d'un seul génome diploïde (2n). C'est durant cette phase G1 que l'événement orientant la cellule vers la division a lieu. Cet événement ou point de restriction est franchi de manière irréversible après le contrôle de l'intégrité du matériel génétique (Maillet, 1999).

L'activité essentielle de la cellule en phase S est la réplication de l'ADN. Le contenu en ADN de la cellule passe de 2n à 4n. Au cours de cette phase, l'essentiel de l'activité de transcription est éteinte, seules les protéines histones sont transcrites (Maillet, 1999). C'est aussi au cours de cette phase que seront dupliqués les centrosomes (Lebart and Mariani, 2009), organites dont la fonction sera décrite dans le sous chapitre consacré à la mitose.

La phase G2 suit la phase S, au cours de cette phase, les protéines nécessaires au bon déroulement de la mitose sont synthétisées. En G2 comme en G1 différents mécanismes vérifient l'intégrité du matériel génétique et conditionnent la progression de la cellule dans le cycle cellulaire (Alberts *et al.*, 1989)(Lebart and Mariani, 2009).

La dernière phase du cycle est la division cellulaire ou mitose. Le déroulement de cette division est décrit dans le sous chapitre qui lui est concerné.

2. La régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est jalonné de points de contrôle, qui conditionnent le passage d'une phase à l'autre. Ces transitions entre les phases sont dépendantes de l'activité de complexes protéiques ayant une activité kinase. (Maillet, 1999)

a. Les complexes kinases dépendantes des cyclines

Depuis les travaux du groupe de Marcel Dorée (Labbé *et al.*, 1988), on sait que le complexe protéique responsable de l'entrée en mitose, le MPF (*M phase promoting factor*), est composé de deux sous unités. L'une de ces sous unités est une sérine thréonine kinase (CDK *cycline dependant kinase*), l'autre est une cycline. Les cyclines forment une famille de protéines dont chaque membre est exprimé de manière spécifique au cours de certaines phases du cycle. Ce groupe a été mis en évidence par les travaux de Tim Hunt (Evans *et al.*, 1983).

Les CDK sont des kinases ayant de multiples substrats, elles sont exprimées de manière constante et ne peuvent être activées que lorsqu'elles sont associées aux cyclines. Ce sont les travaux du groupe de Paul Nurse (Beach *et al.*, 1982) La régulation du cycle cellulaire fait intervenir 4 CDK associées séquentiellement à différentes cyclines (Van den Heuvel, 2005) (Figure 2). L'activation des CDK est assurée par les kinases activatrices des CDK (KAC kinase activatrice des CDK), mais aussi par déphosphorylation par des protéines comme CDC25 (dont il existe 3 isoformes CDC25A, B et C).

Les cyclines sont des protéines exprimées à différents moments du cycle. Elles s'accumulent progressivement, puis sont dégradées (Maillet, 1999). De fait, les complexes CDK/cycline ne sont actifs qu'à certaines phases du cycle. (Figure 2)

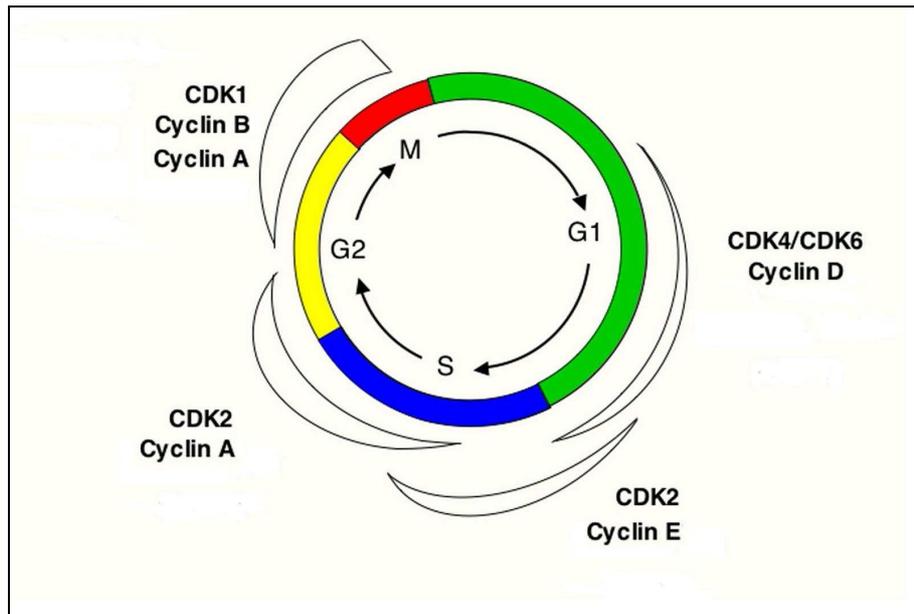


Figure 2 : représentation de l'activité des complexes cyclines/CDK au cours du cycle cellulaire (Van den Heuvel, 2005)

b. Fonction des complexes CDK/Cycline

Les différents complexes CDK/cyclines ont des fonctions clé dans la progression du cycle cellulaire, ainsi :

En phase G1, CDK4 et CDK6 sont associées aux cyclines D. Les complexes constitués permettent la dissociation du complexe protéine RB/E2F (*retinoblastome protein / E2 transcription factor*) en phosphorylant la protéine RB. Le facteur de transcription E2F peut alors induire l'expression de nombreuses protéines comme les cyclines E et A (Van den Heuvel, 2005).

La transition G1/S est assurée par le complexe CDK2/cycline E, qui lui aussi phosphoryle RB (Van den Heuvel, 2005).

Tout au long de la phase S, CDK2 et la cycline A sont associées. Ce complexe a de multiples fonctions, il permet notamment l'accumulation de la cycline B, la duplication du centrosome et la réplication de l'ADN (www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellBM/04G2_M.htm).

Le complexe CDK1/cycline A participe à la transition G2/M, tandis que CDK1/cycline B (le complexe MPF purifié par Marcel Dorée) mène la progression en mitose (Maillet, 1999).

Les complexes CDK/cyclines conduisent la progression du cycle cellulaire, mais n'assurent aucune fonction de contrôle. Il existe des mécanismes visant à contrôler des processus clé du bon déroulement du cycle. Ces points de contrôle lorsqu'ils ne sont pas satisfaits peuvent bloquer l'avancement du cycle. Il s'agit des points de contrôle de la transition G1/S, G2/M et du point de contrôle de la mitose (KAC *kinetochore attachment checkpoint*).

c. Transition G1/S S/G2 et G2/M

Les points de contrôle du cycle cellulaire ont pour fonction d'assurer la transmission aux deux cellules filles du matériel génétique de manière intègre et équitable. Les points de contrôle G1/S, S/G2 et G2/M ne peuvent être franchis que si aucun des mécanismes de réparation de l'ADN n'est actif, notamment le mécanisme de réparation des cassures double brin de l'ADN (*double strand break*, DSB).

Le mécanisme de réparation des DSB permet par l'intermédiaire de nombreux facteurs de recruter le facteur ATM (*ataxia-telangiectasia-mutated*) qui active par phosphorylation la protéine CHK2 (*checkpoint kinase 2*), ou à moindre échelle CHK1 (*checkpoint kinase 1*). Ces dernières protéines ont pour fonction de conduire à la séquestration dans le cytoplasme des isoformes de CDC 25. La déphosphorylation activatrice des complexes CDKs/cyclines qu'opère CDC 25 ne peut donc avoir lieu et la cellule ne progresse plus dans le cycle.

Par ailleurs, CHK2 (ou CHK1) en phosphorylant la protéine P53 limite sa dégradation. L'une des fonctions de P53 est d'induire l'expression d'un inhibiteur des complexes CDKs/cyclines : P21 (Składanowski *et al.*, 2009).

De même, on peut noter que le recrutement d'ATR (*ataxia-telangiectasia- and Rad3-related*) sur un site de DSB peut bloquer le cycle en G1/S par l'intermédiaire de la phosphorylation d'une sous unité du complexe : la cohésine (Kastan and Bartek, 2004) (Watrin and Peters, 2006).

Les sorties des phases G1, S et G2 sont donc, par ces voies, conditionnées au contrôle de l'intégrité du matériel génétique (Bucher and Britten, 2008) (Figure 3).

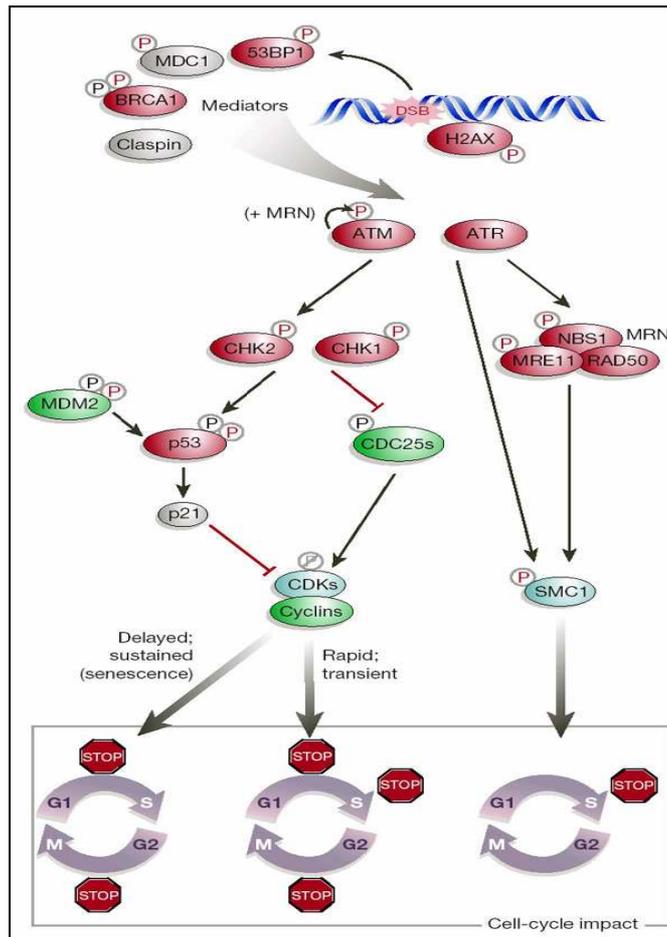


Figure 3 : implication des voies de réparation de l'ADN dans le contrôle du cycle cellulaire. Une DSB induit une phosphorylation de l'histone H2AX, ce qui permet le recrutement de différents médiateurs, aboutissant ainsi au recrutement d'ATM et d'ATR. ATM phosphoryle CHK1 et CHK2, ce qui permet de séquestrer et de dégrader les isoformes de CDC25. ATM, en phosphorylant P53, permet l'expression de P21, qui est un inhibiteur des complexes CDK/cycline. Ces inhibitions conduisent à l'arrêt du cycle en différents points. La transition S/G2 peut en outre être bloquée par la phosphorylation de la sous unité SMC1 du complexe cohésine, via son recrutement par ATR (Kastan and Bartek, 2004).

d. Point de contrôle de la mitose

La répartition équitable du matériel génétique entre les deux cellules filles s'opère au cours de la division cellulaire. Un mécanisme de surveillance permet d'assurer la fidélité de cette distribution. Celui-ci faisant intervenir des structures spécifiques à la division cellulaire, il sera décrit dans le chapitre suivant, décrivant la mitose.

3. La mitose

La mitose est la seule phase du cycle qui est identifiable en microscopie sans employer de marqueur spécifique. La cellule subit au cours de cette phase de profondes modifications morphologiques qui ont permis de la subdiviser en 5 phases successives. En fonction de ces

phases, on pourra distinguer des structures particulières qui favorisent et contrôlent la juste répartition du matériel génétique.

a. Les différentes phases de la mitose

La mitose est subdivisée en 5 phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

En prophase, les chromosomes se condensent et le centrosome se duplique. C'est au cours de cette phase que disparaît le nucléole et que se rompt l'enveloppe nucléaire (figure 4).

Durant la prométaphase, les microtubules naissant des centrosomes progressent et capturent un à un les chromosomes. Les chromosomes s'alignent progressivement sur un plan imaginaire : la plaque métaphasique (figure 4).

La métaphase est une phase où tous les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique. Cet alignement conditionne le passage en anaphase et la sortie de mitose (figure 4).

L'anaphase débute par la rupture des points de cohésion qui persistent entre les deux chromatides formant un chromosome. Tractée par les microtubules, chaque chromatide va alors pouvoir migrer vers un pôle de la cellule (figure 4).

Une fois la migration des chromatides accomplie, un anneau contractile se forme sur la face interne de la membrane cellulaire au niveau du plan équatorial. Cette étape signe le début de la télophase. L'anneau composé se contracte ce qui permet la formation progressive des deux cellules filles. En parallèle, l'enveloppe nucléaire se reconstitue autour des deux lots de chromatides (figure 4).

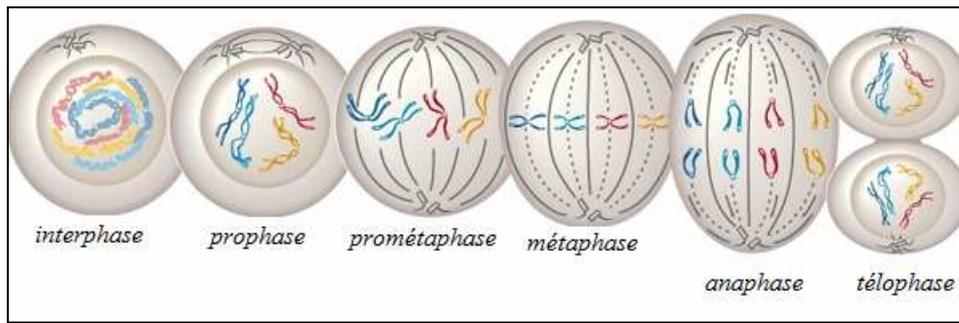


Figure 4 : représentation de l'interphase et des cinq phases de la mitose. (Dictionnaire Larousse)

b. Le chromosome et le fuseau mitotique

Ces cinq phases décrites succinctement font appel à des structures spécifiques de la mitose. Parmi celles-ci, le chromosome mitotique, le centrosome et le fuseau mitotique ont un rôle particulièrement important dans la compréhension du sujet de ce mémoire.

i. Le chromosome mitotique

Les molécules d'ADN ne sont pas présentes à l'état libre dans le noyau de la cellule, elles sont étroitement liées à différentes protéines. On nomme chromatine l'association de l'ADN et de ces protéines. La moitié des protéines de la chromatine est constituée par la famille des histones. Les histones sont des protéines dont la séquence est riche en lysine (K) et arginine (R) qui leur confèrent un caractère fortement basique. Cela permet une forte interaction entre l'ADN (acide) et les histones.

On distingue essentiellement cinq types d'histones (H1, H2A, H2B, H3 et H4) qui s'associent entre eux sous forme d'octamère (2xH2A-H2B et 2x H3-H4). Le nucléosome est formé de l'un de ces octamères d'histones, autour duquel va s'enrouler la molécule d'ADN (2,25 tours ou 200 pdb par nucléosome) (Figure 5). La chromatine a donc une structure qui s'apparente à un collier de perle, avec des nucléosomes reliés par de l'ADN (appelé ADN *linker*).

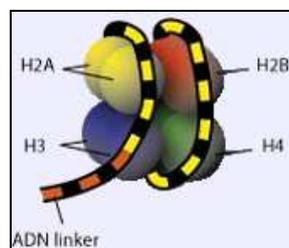


Figure 5 : représentation d'un nucléosome constitué d'un octamère de protéines histones sur lequel s'enroule une molécule d'ADN (<http://atlasgeneticsoncology.org>).

Cet agencement en collier de perle est plus ou moins compacté par enroulement et surenroulement pour former une fibre de chromatine (30 nm de diamètre). Il existe deux

modèles théoriques : le modèle en solénoïde (Figure 6A) ou le modèle en zig zag (Figure 6B), pour expliquer la formation de la fibre de 30 nm. Cette fibre de 30 nm passe par différents états de compaction pour constituer le chromosome métaphasique (Figure 6C).

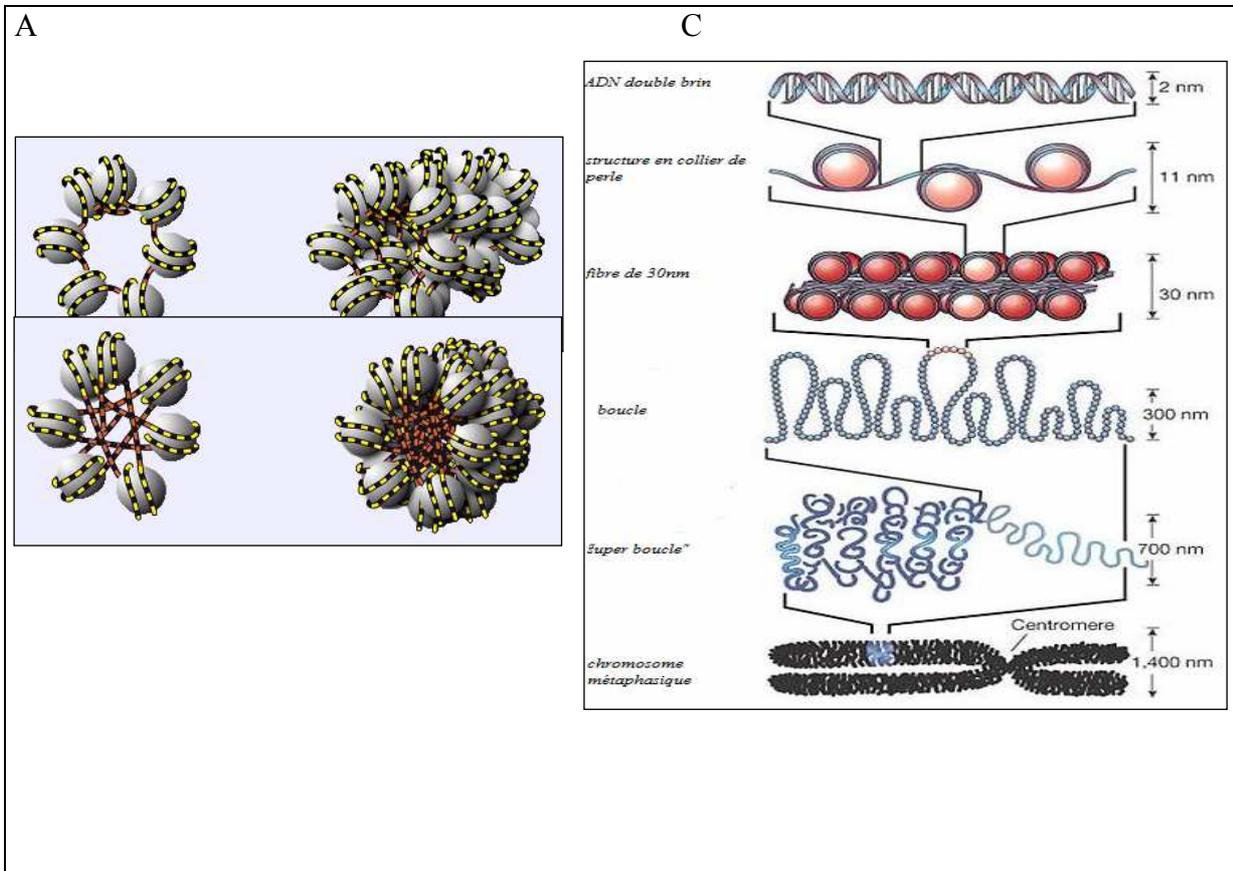


Figure 6 : **A**, fibre de chromatine représentée suivant le modèle en solénoïde où le « collier de perle » s’enroule autour d’un axe imaginaire pour façonner un solénoïde (<http://atlasgeneticsoncology.org>). **B**, fibre de chromatine selon le modèle en zigzag où les nucléosomes se disposent radialement, l’ADN linker étant situé au centre de la fibre (<http://atlasgeneticsoncology.org>). **C**, différents états de condensation de l’ADN.

La condensation de la chromatine pour former le chromosome est assurée par l’intervention de protéines : la topoisomérase II et les condensines I et II. Elle débute en prophase précoce pour atteindre son maximum de condensation en cours de mitose à la fin de la métaphase.

La topoisomérase II permet de linéariser la fibre en supprimant les boucles (La topoisomérase II assure à la fois le clivage et la ligation des brin d’ADN) et les caténations entre les deux chromatides. Les condensines sont une famille protéique composée de deux sous unités SMC2 et SMC4 (*structural maintenance of chromosome 2 et 4*), qui s’associent pour former un V avec deux sites liant l’ATP. Ce complexe est complété par 3 sous unités non SMC (CAP (*chromosome associated protein*) H/H2, CAP D2/D3, CAP G/G2) qui se lient à l’ADN (Pavlova and Zakian, 2003)(Figure 7).

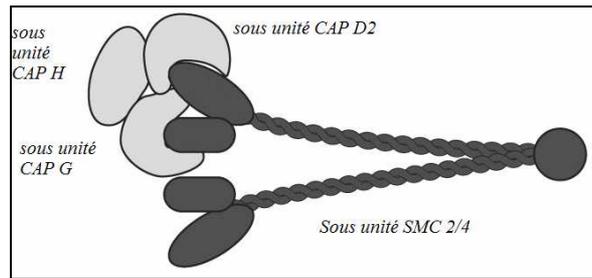


Figure 7 : structure schématique de la condensine avec, en gris clair, les trois sous unité CAP, et en foncé, le dimère SMC composé de SMC2 et SMC 4

Cette structure en forme de pince permet, lors de l'hydrolyse de l'ATP, un basculement de des sous unités SMC, favorisant ainsi la formation de boucles et de super boucles. La condensine II semble agir précocement, tandis que la condensine I, qui a une localisation cytoplasmique en interphase, intervient plus tardivement à des niveaux de compaction plus avancés (Swedlow and Hirano, 2003).

Les chromosomes mitotiques sont constitués de deux chromatides soeurs qui présentent une copie de la molécule d'ADN répliqué en phase S.

Dans leurs structures, les chromosomes mitotiques présentent des régions particulières. On en distingue essentiellement deux : les télomères, situés à l'extrémité des bras du chromosome, et le centromère où subsiste la cohésion entre les deux chromatides soeurs. Le centromère présente des nucléosomes particuliers portant un variant de l'histone H3 : CENP A (*Centromeric protein A*). C'est au niveau du centromère que se constitue un complexe protéique sur lequel viennent se fixer les microtubules : le kinétochore. Certains modèles laissent supposer que la chromatine au centromère serait structurée en solénoïde présentant une face interne portant des nucléosomes H3 et une face externe présentant des nucléosomes CENP A (Blower *et al.*, 2002) (Figure 8).

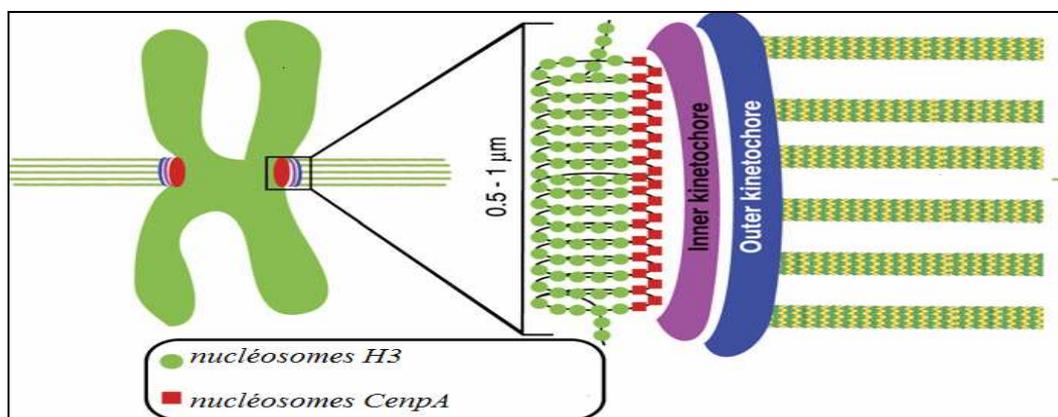


Figure 8 : modèle d'organisation de la chromatine au centromère montrant l'asymétrie de répartition des nucléosomes H3 et Cenp A (Blower *et al.*, 2002)

ii. Le centrosome et le fuseau mitotique

La migration des chromatides sœurs vers les pôles de la cellule en anaphase se fait le long du fuseau mitotique. Celui-ci est constitué par les deux centrosomes reliés par un faisceau de microtubules. On distingue trois classes de microtubules constitutifs du fuseau mitotique : les asters, également appelés microtubules astraux, qui permettent l'ancrage des centrosomes, les microtubules polaires reliant les deux centrosomes, et les microtubules kinétochoriens liant les kinétochores aux centrosomes (figure 9).

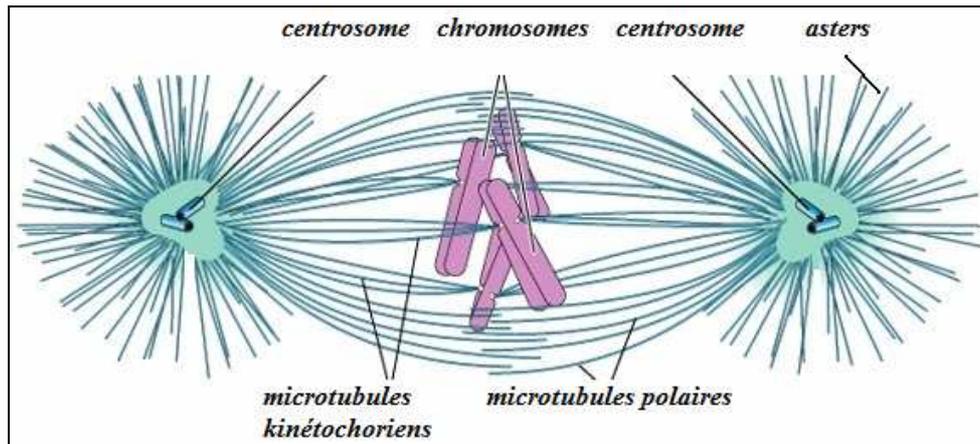


Figure 9 : Organisation du fuseau mitotique entre les deux centrosomes, les microtubules polaires et kinétochoriens forment le fuseau. Les asters assurent l'ancrage du fuseau dans la cellule.

Le centrosome est le centre organisateur des microtubules (MTOC *microtubules organisation center*). Il est composé (chez les vertébrés) de deux centrioles et d'un matériel protéique amorphe : le matériel péricentriolaire (PCM). Les centrioles ont une structure cylindrique et sont composés de neuf triplets de microtubules (figure 10).

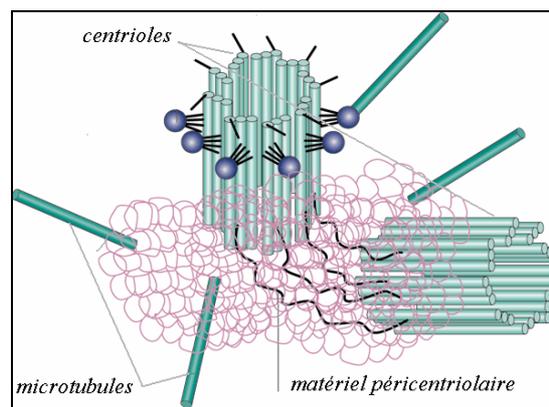


Figure 10 : Représentation schématique du centrosome montrant les centrioles, le matériel péricentriolaire et les microtubules

Unique dans la cellule au cours de la phase G1, le centrosome se duplique en phase S. Les deux centrosomes migreront ensuite chacun vers un pôle de la cellule en prophase de la mitose (Figure 11) (Maillet, 1999).

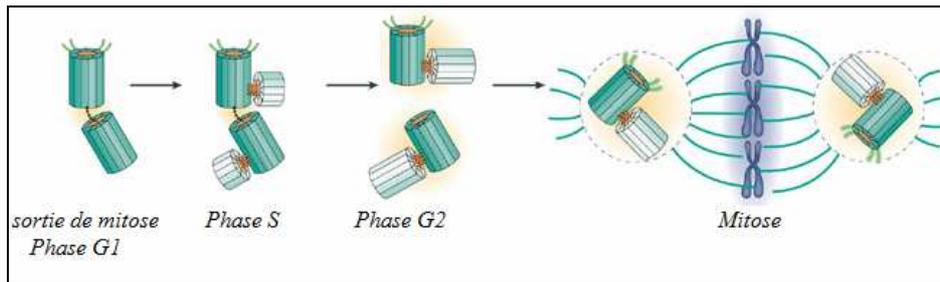


Figure 11 : Le cycle du centrosome. Le centrosome composé de deux centrioles est unique en sortie de mitose et en phase G1. En phase S, chaque centriole donne « naissance » à un nouveau centriole. La cellule contient alors deux centrosomes. En fin de G2 et en début de mitose, les centrosomes entament leur migration vers les pôles de la cellule (Bettencourt-Dias and Glover, 2007).

Le centrosome est le principal centre de formation des microtubules, tant pour la constitution du cytosquelette que pour la formation du fuseau mitotique. Les microtubules sont constitués de 13 protofilaments de polymères de tubuline α et β . Ces protofilaments sont polarisés avec une extrémité + marquée par la tubuline α et une extrémité - identifiée par la tubuline β (figure 11).

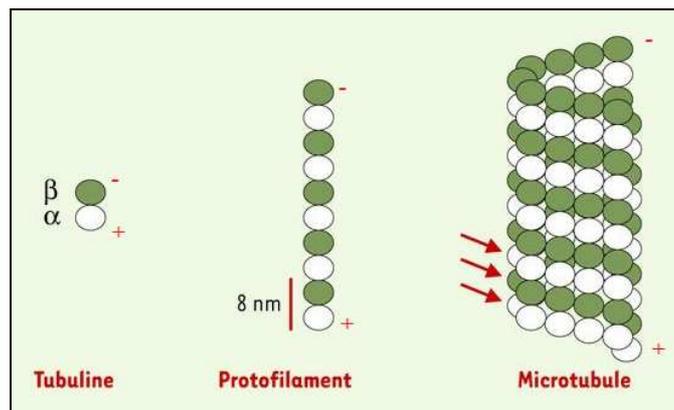


Figure 12 : Organisation d'un microtubule : à gauche, dimère de tubuline α et β , au centre, protofilament composé de dimères de tubuline α et β , à droite, un microtubules formé de 13 protofilaments (Arnal *et al.*, 2002).

La polymérisation s'effectue en 3 phases. Dans une première phase dite de nucléation, l'hydrolyse du GTP (guanosine triphosphate), lié à la tubuline β , en GDP (guanosine diphosphate) permet la liaison entre les tubulines α et β . Les dimères ainsi constitués s'oligomérisent pour constituer les protofilaments. Cette réaction s'opère au centrosome principalement et, dans une moindre mesure, au kinétochore.

Suite à la phase de nucléation, les protofilaments s'allongent par adjonction de dimères aux extrémités + et -. C'est la phase d'élongation.

La liaison entre les tubulines α et β n'est pas covalente, et les protofilaments sont peu stables. Au centrosome et au kinétochore, les extrémités - sont stabilisées, l'élongation du

microtubule se fait donc via l'extrémité +. L'élongation se fait suivant différents cycles de polymérisation (ou phase de sauvetage) et de dépolymérisation (ou phase de catastrophe) conférant aux microtubules une instabilité dynamique (figure 12) (Arnal *et al.*, 2002).

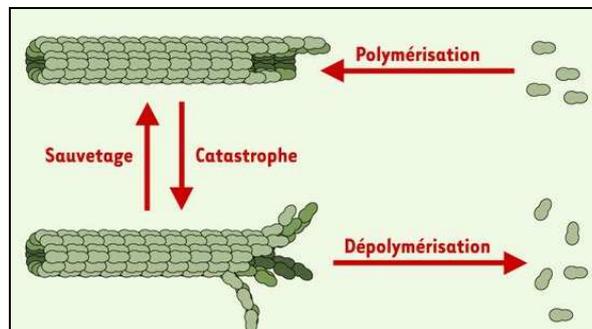


Figure 13 : L'instabilité dynamique des microtubules. La croissance des microtubules alterne entre des phases de polymérisation (ou sauvetage) ponctuées de phases de dépolymérisation (ou catastrophe) (Arnal *et al.*, 2002).

In vivo, la croissance des microtubules est facilitée par les *Microtubules Associated Proteins* (MAP). Celles-ci agissent, soit en favorisant la polymérisation des microtubules, soit en les stabilisant. On peut noter que la famille des MAP comprend la protéine TPX2 (*targeting Protein for Xklp2*), qui permet la régulation de l'activité de la kinase Aurora A. Cette dernière kinase localisée au centrosome et sur les microtubules a un rôle important dans l'établissement du fuseau mitotique (Vader and Lens, 2008) et a de multiples substrats comme le variant d'histone CENP A (Kunitoku *et al.*, 2003).

La déstabilisation des microtubules est favorisée par les facteurs de catastrophe.

Si le centrosome est le centre d'organisation des microtubules, il n'est toutefois pas nécessaire à la constitution du fuseau mitotique bipolaire. En effet des expériences menées sur des extraits d'œuf de *Xenopus laevis* ont permis de montrer que seules des protéines associées aux microtubules sont utiles pour la formation du fuseau mitotique. Ces protéines sont les dynéines et les kinésines. Elles utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour se mouvoir sur les microtubules. Les kinésines se déplacent vers les extrémités + et les dynéines vers les extrémités -. Ce serait le déplacement de ces protéines motrices vers les extrémités des microtubules qui permettrait l'organisation du fuseau mitotique (Arnal *et al.*, 2002).

Au cours de leur croissance, certains microtubules rencontrent et se lient au kinétochore. Ce sont ces microtubules qui permettront la migration des chromatides au cours de l'anaphase. C'est aussi au cours de l'anaphase que les protéines composant le *chromosomal passenger complex* (CPC), présentes au centromère du chromosome métaphasique, se déposent et migrent vers le fuseau central. C'est sur ce fuseau central que va s'établir le *midbody*, structure autour de laquelle va s'effectuer la cytokinèse.

c. Le point de contrôle de la mitose

Comme les transitions entre les phases G1/S S/G2 et G2/M, la sortie de mitose n'est permise que si un point de contrôle est satisfait. Cette fois, ce n'est pas l'intégrité du matériel génétique qui est la cible des mécanismes de contrôle, mais c'est l'attachement correct des chromosomes sur le fuseau mitotique qui est vérifié.

Lorsque les kinétochores ne sont pas liés aux microtubules de manière amphitélique (c'est-à-dire que chaque kinétochore d'un chromosome est lié à un et seulement un pôle du fuseau), le KAC (pour « *Kinetochores Attachment Checkpoint* », souvent improprement appelé « SAC » pour « *Spindle Assembly Checkpoint* ») émet un signal d'attente.

Ce signal d'attente émis par le kinétochore a la capacité de séquestrer CDC20. Cette séquestration de CDC20 a la faculté d'inhiber l'APC/C (*anaphase promoting complex/cyclosom*) qui est une ubiquitine ligase responsable de la dégradation de la cycline B. Ainsi, si l'APC/C est inactif, le MPF (complexe cycline B/CDK1) reste actif et la cellule ne peut sortir de mitose (Musacchio and Salmon, 2007).

Par ailleurs, l'APC/C a un autre substrat que la cycline B, c'est la Sécurine. Cette protéine inhibe une protéase, la Séparase, qui clive le complexe cohésine (ce complexe assure le maintien de la cohésion entre les chromatides sœurs, il sera décrit dans le chapitre décrivant la cohésion entre les chromatides sœurs).

Ainsi, tant que le KAC n'est pas satisfait, la cellule reste bloquée en mitose et les chromatides sœurs ne peuvent se séparer.

En métaphase, quand les kinétochores sont convenablement liés au fuseau, le signal d'attente n'est plus émis par le kinétochore. CDC20 n'est alors plus séquestré et est libre d'activer l'APC/C. La cycline B et la sécurine sont dégradées (figure 14). Le MPF est rendu inactif et la séparase peut cliver les cohésines. La cellule rentre en anaphase (Musacchio and Salmon, 2007).

La régulation des attachements mérotéliques (un kinétochore lié aux deux pôles du fuseau) et syntéliques (les deux kinétochores reliés au même pôle du fuseau) est encore méconnue. Elle fait appel à des senseurs de tension au niveau du centromère. La kinase du CPC, Aurora B, semble fortement impliquée dans ces mécanismes.

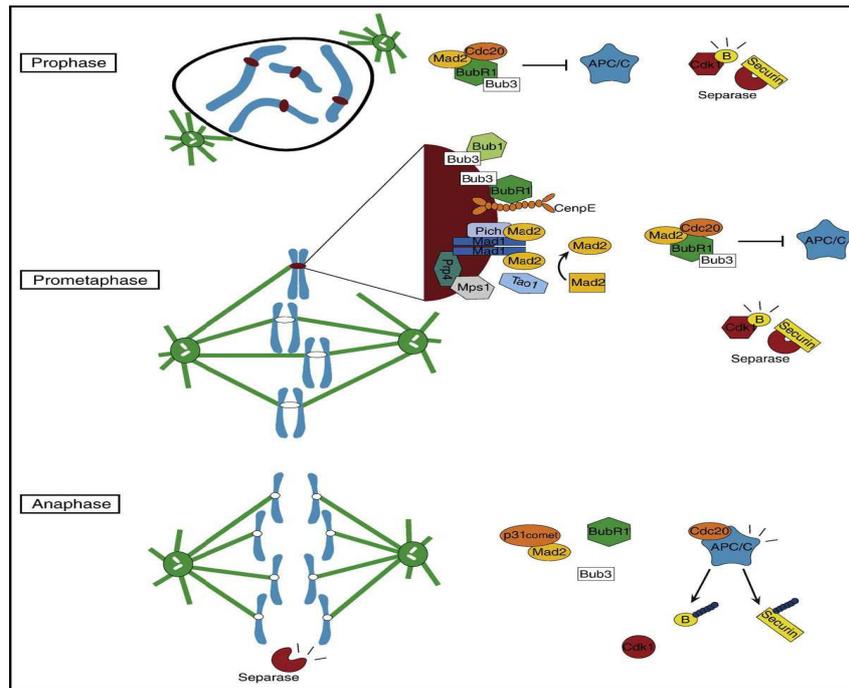


Figure 14 : Le *kinétochore attachment checkpoint*. En haut et au centre, en prophase et en prometaphase, MAD2 (*mitotic arrest deficient 2-like protein 1*) et BUBR1 (*budding uninhibited by benzimidazoles related 1*) changent de conformation sur les kinétochores libres. Ils peuvent alors s'associer à BUB3 (*budding uninhibited by benzimidazoles 3*) pour former le complexe MCC (*Mitotic checkpoint complex*) qui séquestre CDC20 inhibant ainsi l'APC/C. C'est ce changement de conformation de MAD2 et BUB3 qui constitue le signal de non déclenchement de l'anaphase.

En anaphase, tous les kinétochores sont liés au fuseau, MAD2 et BUBR1 ne peuvent plus changer de conformation et constituer le complexe MCC (BUB3 BUBR1, CDC20 et MAD2). Il n'y a donc plus de signal d'attente, CDC20 est alors libre de se lier à l'APC/C, ce qui active sa fonction d'ubiquitine ligase. La cycline B et la Sécurine vont alors être dégradées (Musacchio and Salmon, 2007).

En pratique, la dégradation de la cycline B en anaphase est utilisée pour savoir si des chromatides sœurs observées comme séparées le sont de manière précoce ou normale. Un immunomarquage de la cycline B, ou sa mise en évidence par Western Blot, sont donc utilisés comme marqueur de la non satisfaction du *checkpoint*.

Après avoir présenté le déroulement du cycle cellulaire et de la mitose, cette introduction va maintenant présenter la notion d'épigénétique. Dans un premier temps, des généralités sur ce concept vont être définies, puis les modifications spécifiques des histones au cours de la mitose seront exposées.

II La notion d'épigénétique

1. Définition et exemple

La compréhension du code génétique a été une grande avancée en biologie. Toutefois le concept de transcription-traduction de l'ADN génomique ne permet pas d'élucider les mécanismes de régulation de l'expression des gènes. Des phénomènes biologiques spectaculaires, comme des exceptions aux lois de Mendel, permettent de montrer que le phénotype observé peut s'affranchir de la séquence d'ADN. Ce sont ces phénomènes qui ont permis de définir la notion d'épigénétique.

a. Des exceptions aux lois de Mendel sont liées à des phénomènes épigénétiques

i. Les paramutations

En 2006, l'équipe de François Cuzin montre l'existence de paramutations chez la souris (Rassoulzadegan *et al.*, 2006). La paramutation est un mode d'hérédité qui échappe aux lois de Mendel. Le mécanisme de la paramutation, qui est connu chez le maïs depuis les années 50, décrit une divergence entre le phénotype observé et les allèles présents dans le génome. Pour reprendre l'exemple de la souris, le croisement de souris hétérozygotes pour le gène Kit (souris portant l'allèle sauvage + et un allèle muté -) conduit, suivant les lois de Mendel, à une descendance composée d'un quart de souris +/+, un quart de souris -/- et 50 % de souris hétérozygotes +/- . L'équipe de Cuzin a toutefois constaté une proportion de phénotype hétérozygote pour Kit supérieure à 50%. Ce phénotype anormal chez les souris homozygotes +/+ est par ailleurs transmissible. Le support de cette hérédité est présenté comme l'ARN, car des micro-injections d'ARN transcrit du gène muté dans des œuf de souris sauvages permettent d'obtenir le phénotype de souris homozygotes, phénotype transmissible sur plusieurs générations (Rassoulzadegan *et al.*, 2006).

ii. L'empreinte génomique parentale

On peut observer que le croisement entre une jument et un âne donne naissance à un mulet et que le croisement entre une ânesse et un cheval donne naissance à un bardot. Cette observation permet d'envisager que les gènes s'expriment différemment suivant leurs origines

paternelles ou maternelles. Ce phénomène appelé « *imprinting* » ou empreinte génomique n'est pas lié à une perte de séquence chez l'un des parents, mais à l'extinction sélective de certains gènes provenant soit du père soit de la mère (Gabory *et al.*, 2005).

iii. La variéation par effet de position

La variéation par effet de position à été découverte après irradiation chez *Drosophila megalogaster*. Les mécanismes de réparation par recombinaison homologue peuvent induire un positionnement des gènes différents de celui présent chez les mouches témoins. Il a été constaté que certains gènes normalement actifs pouvaient être éteints s'ils étaient repositionnés dans certaines régions du génome. La transcription d'un gène n'est donc pas uniquement liée à sa séquence, mais elle dépend aussi de l'environnement chromatinien (Lerach *et al.*, 2006).

b. La notion d'épigénétique

Pour pouvoir expliquer ces phénomènes et faire le lien entre la génétique et la biologie du développement, Conrad Waddington a défini en 1942 l'épigénétique comme « la branche de la biologie qui étudie les interactions causales entre les gènes et leurs produits ». Actuellement l'épigénétique est définie comme « l'étude des changements de phénotypes héritable sans changement de séquence de l'ADN ».

2. Mécanismes de la régulation épigénétique

Les régulations épigénétiques permettent de modifier l'expression d'un ou plusieurs gènes. Trois modes de régulation sont étudiés, ils ont tous pour cible soit l'ADN, soit la chromatine.

a. Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est une des modifications épigénétiques les mieux connues. Ce sont les cytosines qui sont modifiées par les DNA méthyl transférase (DNMT). Cette modification est préférentiellement située sur les ilots CpG des promoteurs des gènes. Elle peut être héritée ou bien acquise en fonction des conditions environnementales (elle devient dans ce cas héritable).

Généralement, une faible méthylation est associée à une forte expression du gène. A l'inverse une hyperméthylation à un effet répresseur de l'expression du gène. Il semble que ce soit une

hyperméthylation de l'ADN qui participe au phénomène d'empreinte génomique parentale et de l'inactivation des chromosomes sexuels (Gabory *et al.*, 2005).

b. Les micros ARN

La découverte des micros ARN est liée à la mise en évidence de l'interférence ARN (ARNi) en 1990 par Jorgensen et son équipe lors de leurs travaux sur la couleur des pétales de Pétunia. Cette équipe a mis en évidence que l'injection ARN messager double brin codant pour un gène gouvernant la couleur conduisait de manière surprenante à une décoloration des pétales et non au renforcement de la coloration initialement attendu.

Ce phénomène repose sur l'appariement de petits ARNs (les micros ARNs ou miARN) avec un ARN messager (ARNm). L'ARN double brin ainsi constitué est pris en charge par le complexe RISC (*miRNA-induced silencing complex*) qui inhibera l'expression du ARNm complémentaire du miARN. L'interférence ARN est un mécanisme naturellement présent dans la cellule. Il est aussi couramment utilisé dans les laboratoires pour inhiber l'expression d'un gène. L'emploi de cette technique ayant été systématique dans les manipulations relatives dans ce mémoire.

La régulation épigénétique médiée par les miARN repose sur des séquences non codantes présentes sur le génome. Les miARN sont, semble t'il, impliqués dans l'empreinte génomique parentale et le développement embryonnaire (Stefani and Slack, 2008; Royo and Cavallé, 2008).

D'autres ARNs non codants interviennent dans la régulation épigénétique, ce sont notamment les ARNs responsables de l'inactivation des chromosomes sexuels. Il a ainsi été montré que l'expression de certains ARNs non codants était associée à une hyperméthylation de l'ADN des chromosomes « éteints » (Heard *et al.*, 2004).

c. Les modifications d'histones

Ce sont les travaux de Allfrey (Allfrey and Mirsky, 1964) qui ont permis de suspecter le rôle des modifications post traductionnelles des histones dans la régulation de l'expression des gènes. Cette équipe a montré que la transcription de l'ADN en ARN *in vitro* était inhibée par la présence d'histones, sauf si ces histones étaient acétylées (Jaulin, 2008). Les modifications décrites sont des acétylations, des méthylation (simple ou multiples), des phosphorylations ou bien encore des ubiquitinations (figure 15).

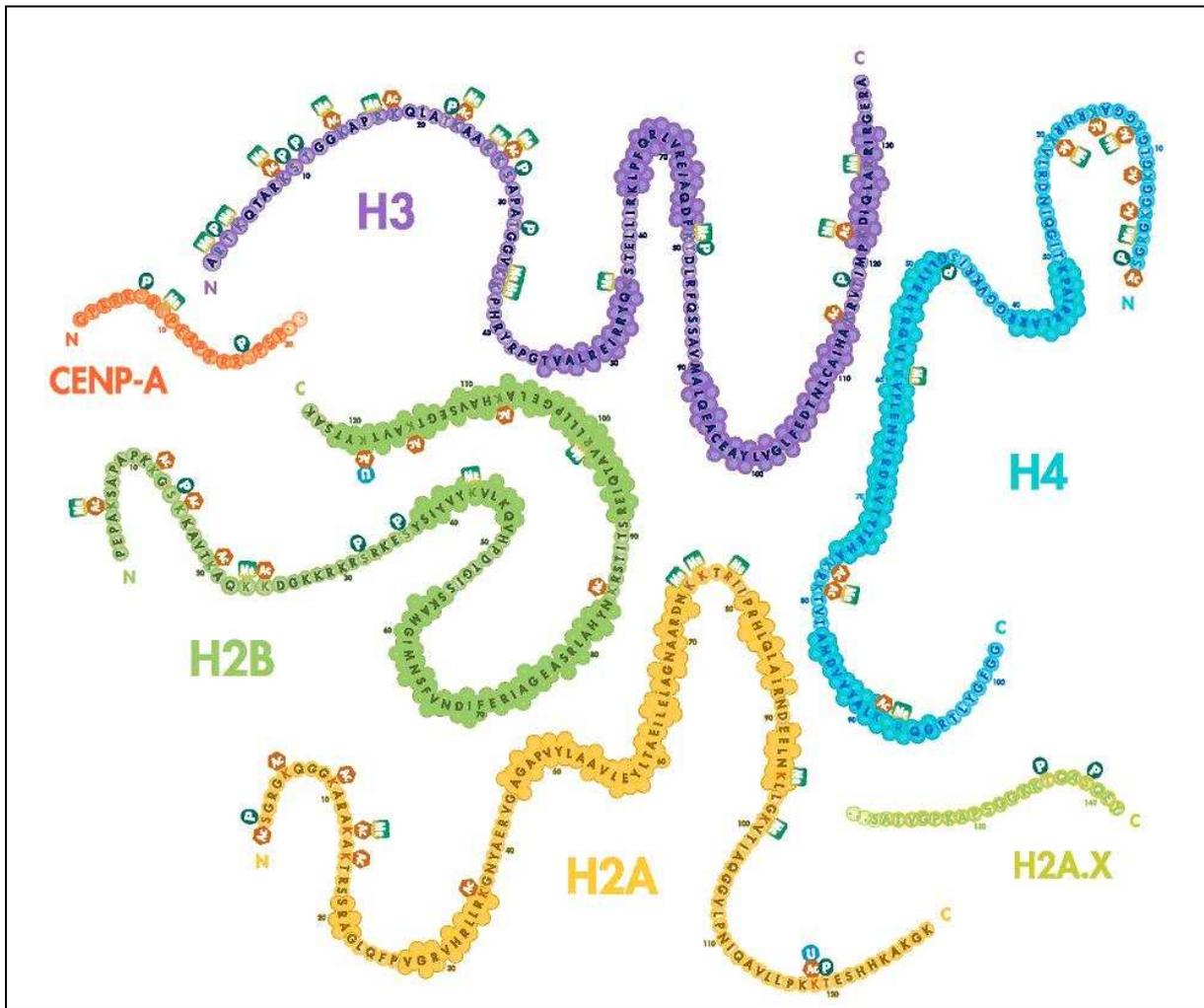


Figure 15 : Modifications post traductionnelles connues des histones et des variants CENP-A et H2A.X. Me : méthylation ;Ac : acétylation ; P : phosphorylation ; U : ubiquitination. D'après poster Millipore (<http://www.millipore.com/techpublications/tech1/pb1014en00>)

Dans la plupart des cas, le rôle précis de ces modifications n'est pas connu. Il est toutefois maintenant montré que les modifications des histones sont associées aux grandes fonctions chromatinienne comme la transcription, la réplication, la réparation de l'ADN ou bien encore la recombinaison homologue (Jaulin, 2008). Ces modifications constituent alors de véritables marques épigénétiques d'une situation donnée.

d. La notion de code histone

David Allis jette les bases de la notion du « code histone » en 2000 (Strahl and Allis, 2000, Jenuwein and Allis, 2001). Cette hypothèse repose sur le fait que les histones et notamment leurs extrémités N terminales subissent de nombreuses modifications post traductionnelles et que certaines d'entre elles ont déjà été associées à une fonction biologique particulière (comme la transcription et l'acétylation des histones décrite par Allfrey).

« L'hypothèse du code histone postule que des modifications multiples des histones, intervenant de façon combinatoire ou séquentielle sur une ou plusieurs partie(s) n-terminale(s) d'histone(s), spécifieraient des fonctions uniques en aval » (Stralh et Allis)

On ne connaît que peu de choses sur le code histone actuellement, aucun cadre de lecture, s'il existe (l'équivalent du codon en génétique) n'a pour l'heure été dégagé, les modifications pouvant intervenir sur les huit histones qui composent le nucléosome et sur les nucléosomes adjacents. Toutefois, il est clairement établi que certaines modifications sont spécifiques de certaines situations. C'est notamment le cas au cours de la mitose. La présence de marques spécifiques pour certaines fonctions biologiques laisse supposer l'existence d'autant de codes histones que de fonctions chromatiniennes.

3. Les marques spécifiques de la mitose

Certaines modifications post traductionnelles d'histones ne sont présentes qu'au cours de la mitose sur l'ensemble du chromosome ou bien sont présentes uniquement sur des zones bien particulières.

Les modifications d'histones les plus fréquemment décrites et qui ont fait l'objet d'une attention particulière au cours de cette étude vont être décrites dans ce sous chapitre.

a. Phosphorylation de H3S10

La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10ph) est la première marque spécifique de la mitose décrite (Paulson and Taylor, 1982). Cette phosphorylation est présente sur l'ensemble du chromosome (Figure 17) et débute en fin de G2. Elle disparaît ensuite brutalement en anaphase. C'est essentiellement la kinase Aurora B qui est responsable de cette modification (Vader and Lens, 2008). Toutefois, l'apparition de cette phosphorylation dans la région pericentromérique, qui diffuse ensuite sur les bras du chromosome, laisse supposer l'intervention d'autres kinases. En effet, ce chemin est à l'inverse de celui parcouru par Aurora B qui est une protéine du *Chromosome Passenger Complex* (CPC) qui, lui parcourt les bras en direction du centromère au cours de la prophase (Delacourt-Larose, 2008). En outre, la déplétion d'Aurora B par ARNi laisse subsister un marquage H3S10 plus faible, mais toujours présent sur le chromosome (Adams *et al.*, 2001). La kinase PLK1 (*Polo Like Kinase 1*) est une bonne candidate pour suppléer Aurora B dans la phosphorylation de H3S10.

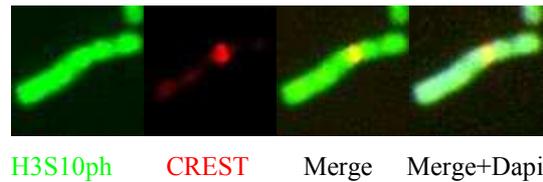


Figure 17: Illustration par immunofluorescence de la localisation de H3S10ph. En vert, le marquage H3S10ph ; en rouge, marquage CREST permettant de localiser les kinétochores ; Merge, superposition des deux longueurs d'onde ; Merge plus, Dapi (colorant de l'ADN) permettant de visualiser la colocalisation du marquage H3S10ph sur l'ensemble des bras du chromosome.(x1200)

La fonction précise de H3S10ph n'est pas connue, certains suggèrent son implication dans la condensation du chromosome (Johansen and Johansen, 2006).

En pratique, l'immunomarquage H3S10ph est très utilisé pour identifier les cellules en mitose en raison de la forte intensité du signal (figure 18), cela permet d'établir aisément et de manière reproductible des indices mitotiques.

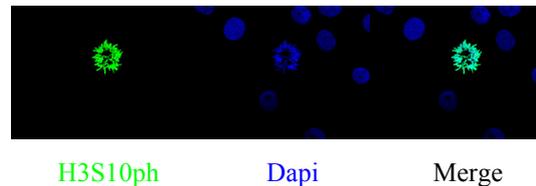


Figure 18 : Microphotographie illustrant l'intérêt de l'utilisation du marquage H3S10ph pour discriminer les cellules mitotiques des cellules en interphase. En vert, le marquage d'une figure mitotique (prométaphase) par l'anticorps anti H3S10ph. En bleu, la coloration par le Dapi (colorant de l'ADN mettant en évidence l'ensemble des cellules présente sur le champ microscopique). Merge : superposition des deux longueurs d'onde. Sur ce champ, l'indice mitotique est de 10% (une cellule marquée pour 10 cellules présentes sur le champ). (x400)

b. Phosphorylation de H3T3.

La phosphorylation de la thréonine 3 de l'histone H3 (H3T3ph) a été décrite par l'équipe de Jonathan Higgins en 2006 (Dai *et al.*, 2006). Tout comme H3S10ph, H3T3ph apparaît en fin de G2 et disparaît en anaphase (Higgins, 2010). Le profil de la phosphorylation de H3T3 est inverse de celui de H3S10. En fin de G2, la modification est présente sur les bras du chromosome, puis elle se concentre au centromère pour disparaître le long des bras (figure 19).

C'est la kinase Haspin qui est responsable de cette modification. Cette protéine a pour uniques substrats identifiés H3T3 et elle-même.

Le rôle de la phosphorylation de H3T3 n'est pas connu, elle est toutefois fortement impliquée dans la cohésion entre chromatides sœurs (Dai *et al.*, 2006). La déplétion de l'Haspin par ARNi conduit à une séparation précoce des chromatides sœurs (PSCS) massive (près de 50 % des cellules mitotiques observées dans cette étude présentent ce phénotype).

En pratique, c'est le marquage H3T3ph qui est utilisé pour mettre en évidence l'activité de l'Haspin, car il n'existe pas d'anticorps anti Haspin.

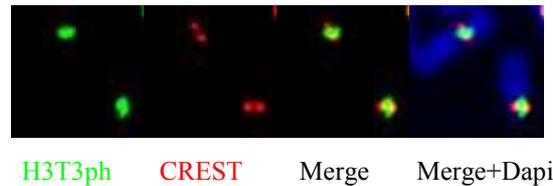


Figure 19 : Illustration par immunofluorescence de la localisation de H3T3ph sur un étalement de chromosome métaphasique. En vert, le marquage H3T3ph ; en rouge, les kinétochores sont localisés par le CREST ; Merge, superposition vert rouge ; Merge plus Dapi permet de mettre en évidence la localisation uniquement centromérique du marquage H3T3ph sur le chromosome métaphasique.(x1200)

c. Diméthylation de H3K4

C'est en procédant à une étude systématique par immunomarquages au centromère avec les anticorps « anti-modifications d'histones » disponibles en 2004 que la diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4dm) a été mise en évidence (Sullivan and Karpen, 2004). Cette modification est présente sur les bras du chromosome et au centromère, elle est par ailleurs exclue des régions pericentromériques (figure 20).

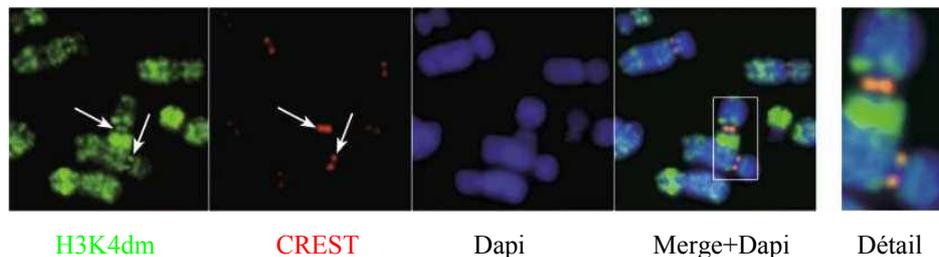


Figure 20 : Immunofluorescence montrant en vert, le marquage H3K4dm sur l'ensemble du chromosome à l'exclusion de la région péricentromérique. En rouge, le marquage des kinétochores par le CREST. Le Dapi colore l'ADN et montre l'aspect du chromosome. Merge plus Dapi montre la superposition du marquage CREST et H3K4dm au centromère et sur les bras du chromosome. Les flèches présentent les images les plus représentatives. (Adapté de Eot-Houllier *et al.*, 2008).

La méthyltransférase responsable de cette diméthylation au centromère est pour l'heure inconnue et la fonction précise de cette diméthylation reste mystérieuse. L'équipe "épigénétique et cancer" a toutefois montré que cette modification n'est rendue possible qu'après la déacétylation de cette lysine 4 de l'histone H3 par HDAC 3 (Histone Déacétylase 3) (Eot-Houllier *et al.*, 2008). Dans ce même article est mise en évidence l'implication de H3K4dm dans le maintien de la cohésion au centromère du chromosome métaphasique.

d. Phosphorylation de CENP-AS7

En prophase (probablement aussi en fin de G2), CENP A, le variant centromérique de l'histone H3, est phosphorylé sur sa sérine 7 (CENP A S7ph). Cette phosphorylation est initiée par la kinase Aurora A (normalement associé aux microtubules), puis entretenue par Aurora B (Kunitoku *et al.*, 2003). A la fin de 2008, l'équipe "épigénétique et cancer" a mis en évidence la présence d'Aurora A au centromère du chromosome métaphasique (non publié). Par ailleurs, Kunitoku et son équipe décrivent des défauts d'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique dans des lignées surexprimant un mutant de CENP-A dans lequel la sérine 7 a été substituée par un acide aminé non-phosphorylable : l'alanine. Ces défauts d'alignement étant souvent le signe de la perte précoce de la cohésion entre les chromatides sœurs, on peut légitimement supposer une implication de CENP AS7ph et d'Aurora A dans la cohésion entre chromatides sœurs. Cette hypothèse fonde l'un des aspects du travail relaté dans ce mémoire.

e. Autres modifications d'histones retrouvées en mitose

Plusieurs autres modifications des protéines histones ont été retrouvées au cours de la mitose. Par exemple, on peut noter la phosphorylation de la serine 28 de l'histone H3. Cette phosphorylation a un profil très similaire à celle de H3S10ph, elle survient toutefois un peu plus tardivement. Là encore, Aurora B semble être l'enzyme qui catalyse cette modification.

Un autre type de modification touche les histones H3 et H4 au cours de la mitose, il s'agit de la déacétylation de ces protéines (lysines 5, 8, 12, 16 de H4 et lysines 18 et 23 de H3). Il est probable que cette vague de déacétylations soit impliquée dans l'extinction de la transcription au cours de la mitose.

Plus récemment, Y. Watanabe a décrit une phosphorylation de l'histone H2A sur la thréonine 120. Cette phosphorylation est catalysée par la protéine BUB1 (*budding uninhibited by benzimidazoles*) et est impliquée dans le recrutement de la Shugoshine, elle-même indispensable pour la protection de la cohésion au centromère (Kawashima et al).

A l'heure actuelle, aucune carte des modifications post traductionnelles des histones au cours de la mitose n'a été établie. La découverte de ces modifications se fait au « coup par coup », en fonction de la recherche des substrats de certaines protéines, comme ce fût le cas pour la phosphorylation de H3T3 par l'Haspin, et de l'histone H2AT120 par BUB1. Un des projets de l'équipe "épigénétique et cancer" serait de dresser cette carte par une approche protéomique.

Après avoir brièvement présenté le concept de l'épigénétique, la troisième partie de l'introduction va maintenant décrire le mode de gestion de la cohésion entre les chromatides sœurs au cours du cycle cellulaire.

La cohésion entre chromatides sœurs

1. Le complexe cohésine

C'est un complexe protéique qui assure l'essentiel de la cohésion entre les chromatides. Ce complexe est constitué d'une structure permanente (formée autour d'un dimère de protéine SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*)), à laquelle s'associent transitoirement d'autres protéines.

a. La famille des protéines SMC

Les cohésines ont été découvertes en 1993 dans des mutants de *Saccharomyces cerevisiae* qui présentaient des défauts de ségrégation de leurs chromosomes. Les gènes codant pour les protéines impliquées dans ces phénotypes, ont été nommés « *Structural Maintenance of Chromosomes* » (SMC). Les gènes de la classe SMC ont ensuite été identifiés chez les vertébrés, les nématodes, les insectes, les plantes et les procaryotes. Leur existence est univoque dans le vivant. Chez les eucaryotes, on retrouve essentiellement 6 gènes codant pour des protéines SMC nommées SMC 1 à 6 (Pavlova and Zakian, 2003)

Ces protéines présentant des domaines N et C terminaux conservés se retrouvent à l'état d'homo ou d'hétérodimères dans la cellule. La partie centrale de la protéine est composée d'un domaine « charnière » flanqué de domaines hélicoïdaux. La dimérisation s'effectue par le biais du domaine « charnière ». Le domaine charnière confère de par sa structure une forte flexibilité à la protéine, tandis que les domaines N et C terminaux portent les sites actifs (liaison à l'ADN et de l'ATP). (Figure 21).

Les dimères de protéines SMC sont constitutifs de nombreux complexes. Les dimères SMC2/SMC4 sont retrouvés, par exemple dans le complexe Condensine. Celui-ci participe à la condensation de la chromatine. Le complexe cohésine et comprend un dimère SMC1/SMC3, il est impliqué dans la cohésion des chromatides (Barbero, 2009; Pavlova and Zakian, 2003).

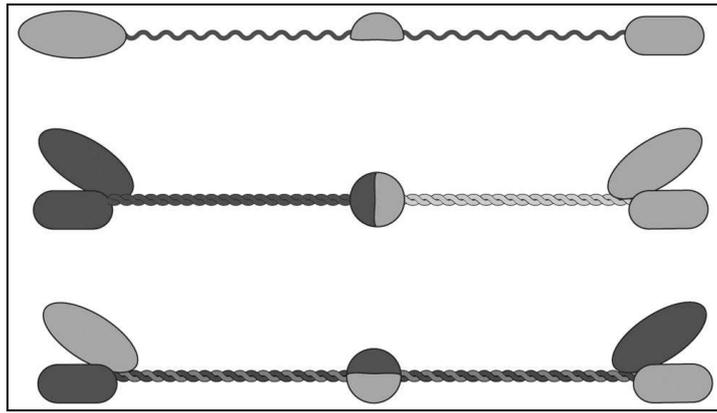


Figure 21 : En haut, une protéine SMC montrant à gauche le domaine N terminal « P-loop ». Au centre, le domaine charnière, et à droite, le domaine C terminal. En bas, deux modèles de dimérisation possibles, avec, soit une dimérisation par le domaine charnière (au centre), soit une dimérisation en double hélice sur toute la longueur de la protéine. D'après Pavlova 2003

b. Les sous unité non SMC

i. SCC1

La protéine SCC1 (*Sister Chromatid Cohesion protein 1*) appartient à la famille des kleisin (pont en grec). Elle assure la liaison entre les têtes d'un dimère de protéines SMC. La partie N terminale de SCC1 se lie à SMC3, la partie C terminale à SMC1 (Pavlova and Zakian, 2003) (figure 22).

ii. SCC3

Il existe deux homologues de SCC3 (*Sister Chromatid Cohesion protein 3*): SA1 et SA2 (*Stromal antigen 1 et 2*) dont les structures n'ont pas à l'heure actuelle été élucidées. Il a été constaté que SA2 est plus abondant dans les cellules somatiques et que SA1 est plus fréquent dans les cellules germinales. SA1 ou SA2 interagissent avec SCC1 (Pavlova and Zakian, 2003)(figure 22).

iii. Structure du coeur du complexe

L'assemblage de SMC1, SMC3, SCC1 et SA1 ou SA2 compose le coeur du complexe cohésine. L'intégrité de tous ces composants est nécessaire au maintien de la cohésion.

Le dimère de sous unité SMC conditionne l'architecture du complexe. Le domaine charnière flexible permet la formation d'un anneau qui est clos par la sous unité SCC1. Cet anneau présente un diamètre de 45 ou 50 nm (Peters *et al.*, 2008) (figure 22).

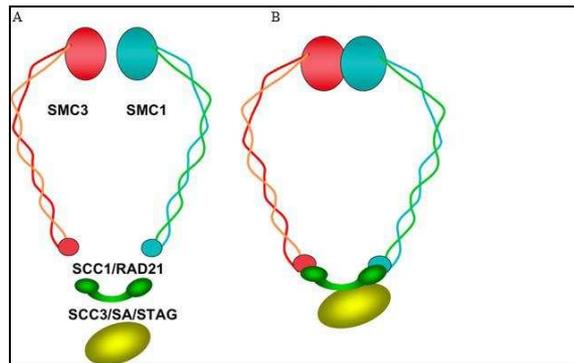


Figure 22 : A : Vue éclatée du complexe cohésine, présentant les différentes sous unités. B : Le mode d'association des différentes sous unités entre elles (Barbero 2009)

c. Les protéines transitoirement associées aux cohésines

Trois classes de protéines interagissant transitoirement avec les cohésines et ayant un lien direct avec l'activité du complexe ont été identifiées.

Il s'agit des protéines SCC2 (*Sister chromatid cohesion protein 2*), cette famille comprend deux membres (PDS5A et PDS5B) qui interagissent respectivement avec les cohésines^{SA1} et cohésines^{SA2}. Chez les vertébrés, la déplétion des protéines de la famille PDS5 n'a aucun impact sur la cohésion des chromatides soeurs. Leurs fonctions restent obscures (Peters *et al.*, 2008).

Une autre protéine interagit transitoirement avec les cohésines. Il s'agit de WAPL (*Wing apart like protein*). Elle interagit avec SCC1 et SCC2 et semble être associée au retrait des cohésines de la chromatine (Pavlova and Zakian, 2003; Peters *et al.*, 2008).

Enfin, une dernière protéine est connue pour interagir avec les cohésines, il s'agit de la sororine, dont la déplétion provoque des défauts de cohésion entre les chromatides soeurs agissant comme un antagoniste de WAPL (Nishiyama *et al.*). C'est un substrat du complexe APC/C (Schmitz *et al.*, 2007)

d. Fonctions du complexe cohésine

i. Fonction de maintien de la cohésion entre chromatides soeurs

L'implication des cohésines dans la fonction de cohésion est clairement démontrée. Il a été montré que ce complexe, présent sur les chromosomes dans les premières phases de la mitose, était absent lors de la dernière phase : l'anaphase (Waizenegger *et al.*, 2000)(Guacci *et al.*, 1994)

Des études par mutagenèse dirigée contre les sous unités du complexe ont prouvée le rôle du complexe dans le maintien de la cohésion. L'induction de la protéolyse de ce complexe induit aussi un défaut de cohésion. Les différents modèles permettant d'expliquer comment les

cohésines assurent cette fonction de cohésion seront présentés dans le chapitre consacré à l'établissement de la cohésion.

ii. Autres fonctions

Le complexe cohésine est connu pour avoir un rôle dans la réparation de l'ADN (nous avons vu dans la première partie que ce complexe était l'un des substrats de la voie médiée par la protéine ATR). Il est aussi suspecté que les cohésines aient un rôle dans la transcription. (pour revue voir (Peters *et al.*, 2008))

4. Etablissement et maintien de la cohésion

a. Etablissement de la cohésion

La cohésion entre les chromatides sœurs s'établit sur toute la longueur du chromosome dès le passage de la machinerie de réplication. C'est la protéine ECO1 (une acétyl transférase) qui assure l'établissement de la cohésion (sa déplétion engendrant des défauts majeurs de cohésion) (Peters *et al.*, 2008). Plusieurs modèles s'affrontent pour expliquer le mode d'association entre les cohésines et la chromatine.

i. Modèle à un seul anneau

Le modèle le plus communément admis est celui à un seul anneau proposé par Nasmyth (Ivanov and Nasmyth, 2005) (figure 23). Selon ce modèle, un seul anneau contient les deux chromatides. Il existe des limites à ce modèle comme le manque de flexibilité des cohésines, rendant leurs implication dans les fonctions de réplication, de réparation et de transcription délicate à comprendre (Zhang *et al.*, 2008).

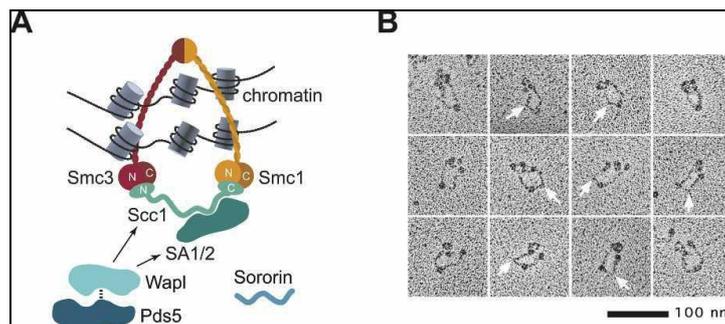


Figure 23 : A : modèle à un seul anneau de Nasmyth, montrant les deux chromatides sœurs enserrés dans l'anneau formé par le complexe cohésine.. B : vue en microscopie électronique de la structure annulaire des cohésines (Peters 2009)

ii. Modèle en menottes

Face à ces limites, Zhang a publié en 2008 un nouveau modèle baptisé modèle en « menottes » (Zhang *et al.*, 2008). Ce modèle prédit une interaction entre deux complexes

cohésines par l'intermédiaire de SCC3. Chaque anneau embrasserait une chromatide. Ce modèle permettrait une meilleure mobilité de l'ADN au sein de l'anneau. (figure 24).

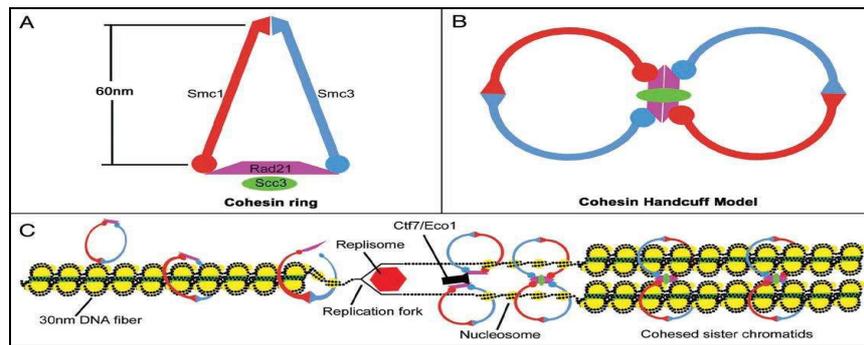


Figure 24 : A : Rappel de la structure des cohésines. B : Schématisation de l'association des cohésines dans le modèle en menottes par le biais de la sous unité SCC3. C : Etablissement de la cohésion. Selon ce modèle, avant la réplication, la chromatine est enserrée par un complexe cohésine. Celui-ci est déposé avant le passage du réplisome. Après la réplication, chaque chromatide sœur est enserrée par une cohésine. Les cohésines de chaque chromatide sœur sont ensuite reliées par la sous unité SCC3, donnant à ce nouveau complexe un aspect de menotte (Zhang *et al.*, 2008).

b. Maintien de la cohésion

La mécanistique du maintien de la cohésion au cours de la phase G2 est relativement méconnue. Il a été montré que la Sororine est impliquée dans cette voie (Schmitz *et al.*, 2007).

5. Séparation séquentielle des chromatides sœurs

L'un des enjeux de la mitose est de transmettre au deux cellules filles l'une des deux chromatides et seulement une seule. Pour permettre cette séparation, les cohésines doivent être déposées. Cette opération s'effectue en deux temps suivant deux voies bien distinctes.

a. La voie de la prophase

En prophase, les cohésines situées sur les bras du chromosome sont phosphorylées sur la sous unités SCC3. Cette phosphorylation semble favoriser l'action de WAPL qui provoque l'ouverture de l'anneau (Peters *et al.*, 2008). Ce sont PLK1 et Aurora B, la kinase du « *chromosomal passenger complex* », qui assurent cette phosphorylation.

Les cohésines au centromère sont protégées contre l'action de ces kinases par la Shugoshin (esprit gardien en japonais) qui sert de plateforme à la phosphatase PP2A (*protein phosphatase 2A*), qui contrebalancerait l'action de PLK1 et d'Aurora B (Kitajima *et al.*, 2004, Takata *et al.*, 2007, Black *et al.*, 2007) (figure 25).

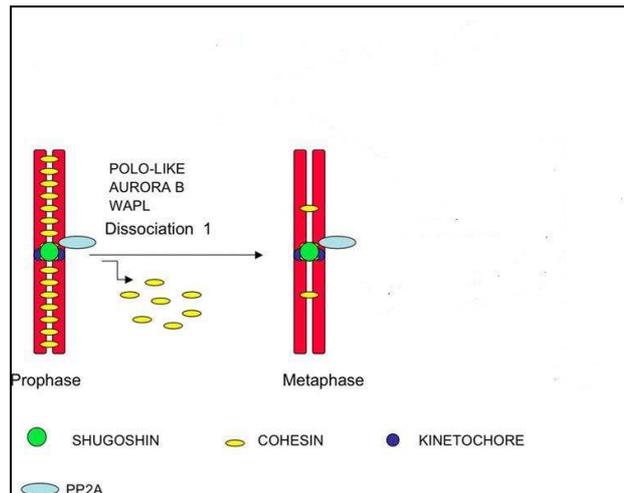


Figure 25 : Représentation de la suppression des cohésions sur les bras du chromosome au cours de la prophase. Les kinases Polo, Aurora B phosphorylent les cohésines. WAPL peut alors dissocier les cohésines et les bras des chromosomes se séparent. Au centromère, la cohésion est protégée par la Shugoshin et PP2A (*protein phosphatase 2A*) (Black *et al.*, 2007).

b. La voie de l'anaphase

Au début de l'anaphase, les cohésines présentes au centromère sont hydrolysées pour permettre la séparation des deux chromatides sœurs. L'enzyme responsable de cette réaction est la séparase qui est libérée lorsque le checkpoint de la mitose est satisfait.

La perte de la cohésion entre les chromatides au centromère en anaphase est l'une des étapes clés de la bonne conduite de la mitose. Si les mécanismes qui concourent à cet événement commencent à être bien compris, la voie qui conduit au maintien de la cohésion au centromère avant l'anaphase est par contre méconnue. Mieux comprendre les interrelations entre les protéines connues pour être impliquées dans cette voie est l'objectif principal des travaux effectués au cours de ce stage.

IV. Elaboration du modèle de transduction du signal de la cohésion au centromère

Après avoir introduit les notions de cycle cellulaire, de mitose et de régulation épigénétique, cette introduction a présenté la fonction de cohésion entre chromatide sœurs. A chacune de ces étapes, des protéines ou des modifications post traductionnelles impliquées dans le maintien de la cohésion ont été mentionnées. Parmi celles-ci, celles ayant une activité catalytique connue sur les histones, notamment l'histone H3 ou son variant CENP A, ont été retenues dans un modèle de régulation du maintien de la cohésion au centromère par l'équipe "épigénétique et cancer".

1. Protéines retenue dans ce modèle

a. HDAC3

HDAC 3 a été retenue suite aux travaux menés dans l'équipe (Eot-Houllier *et al.*, 2008). Dans cet article, il est montré l'implication d'HDAC 3 dans le maintien de la cohésion et que sa déplétion conduit à la perte de la localisation centromérique de la Shugoshin.

b. BUB1

BUB1 a été incluse car sa déplétion conduit à la perte de la localisation de la Shugoshin (Kitajima *et al.*, 2004). Son impact sur la cohésion n'est toutefois pas encore clairement défini.

c. Shugoshin

La Shugoshin est la protéine la plus reconnue comme assurant le maintien de la cohésion. Sa déplétion conduit à une séparation précoce des chromatides sœurs massive (+90% des cellules en mitose présentent ce phénotype et + de 50% des cellules sont bloquées en mitose) (Kitajima *et al.*, 2004). Elle a donc tout naturellement été incluse dans cette étude.

d. Aurora A

La démonstration du rôle d'Aurora A dans la phosphorylation de CENP A S7 (Kunitoku *et al.*, 2003), ainsi que les travaux préliminaires sur le lien entre cette phosphorylation et la fonction de cohésion ont conduit l'équipe à chercher la présence de cette kinase au centromère. La présence d'Aurora A au kinétochore n'avait jamais été décrite auparavant. Il était connu que l'inactivation d'Aurora A conduisait à un phénotype de *lagging chromosomes* (chromosomes ne se déplaçant pas en anaphase). L'expérience de l'équipe de ce phénotype de *laggin chromosomes* a permis de préciser que ce phénotype était relié à une séparation précoce des chromatides sœurs. Il convenait alors d'intégrer cette nouvelle protéine dans la voie de signalisation de la cohésion au centromère.

e. CENP A

L'implication de la phosphorylation de la sérine 7 de ce variant d'histone dans la fonction de la cohésion fait partie intégrante de la thématique de recherche du laboratoire. Le laboratoire disposant de lignées mutantes HA-CENP A S7A (mutant exprimant une version "taguée" HA de CENP A, où la sérine 7 est substituée en alanine et dont l'expression du CENP A endogène peut être sélectivement éteinte par ARNi), l'étude de cette modification et de son influence sur la localisation des autres protéines a constitué le cœur de l'étude.

f. Aurora B

Aurora B a été intégrée dans ce modèle compte tenu de son implication dans la phosphorylation de CENP A S7. Par ailleurs, elle est souvent délocalisée lors de déplétions de

protéines reliées à cette fonction de cohésion au centromère (Eot-Houllier *et al.*, 2008)(Dai *et al.*, 2006).

g. Haspin

Le rôle de l'Haspin dans le maintien de la cohésion a été montré par l'équipe de Jonathan Higgins (Dai *et al.*, 2006), sa déplétion conduit à une perte de la cohésion sans perte de la localisation de la Shugoshin.

2. Synthèse des connaissances actuelles et élaboration du modèle expérimental

L'objectif des travaux relatés dans ce mémoire est de relier suivant un ordre chronologique l'intervention de ces protéines dans le maintien de la cohésion. Une relecture de la bibliographie couplé à un raisonnement itératif a conduit à l'élaboration d'un modèle ayant à son sommet HDAC3, car la déplétion d'HDAC3 conduit à une perte de la localisation de Shugoshin, d'Haspin et Aurora B (Eot-Houllier *et al.*, 2008). L'intervention d'HDAC3 en amont de BUB1 est à démontrer.

La déplétion de BUB1 conduisant à la perte de la Shugoshin (Kitajima *et al.*, 2004), le modèle expérimental a situé cette protéine entre HDAC3 et Shugoshin.

Shugoshin a été située en amont d'Aurora A, des expériences préliminaires ayant conclu que la localisation centromérique d'Aurora A était perturbée lors des déplétions de la Shugoshin.

Naoko Kunitoku ayant montré qu'Aurora A phosphorylait CENP A S7 avant Aurora B (Kunitoku *et al.*, 2003), ces deux protéines ont été intégrées dans cet ordre.

Enfin, Aurora B a été située en amont de l'Haspin suite à une communication personnelle entre Christian Jaulin et Jonathan Higgins.

Ainsi, le modèle de la voie de transduction du signal de la cohésion a été établi d'amont en aval : HDAC 3 déacétyle H3K4, ce qui permet sa diméthylation. H3K4dm permet la localisation de BUB1. La phosphorylation d'H2A par BUB1 autorise la localisation de la Shugoshin. Shugoshin au centromère localise Aurora A qui phosphoryle CENPA S7. Cette phosphorylation est alors entretenue par Aurora B, ce qui force sa localisation centromérique. Aurora B activant Haspin par phosphorylation, celle-ci se localise au centromère et phosphoryle l'H3T3. Cette phosphorylation est la dernière modification d'histone connue impliquée dans le maintien de la cohésion (Figure 26).

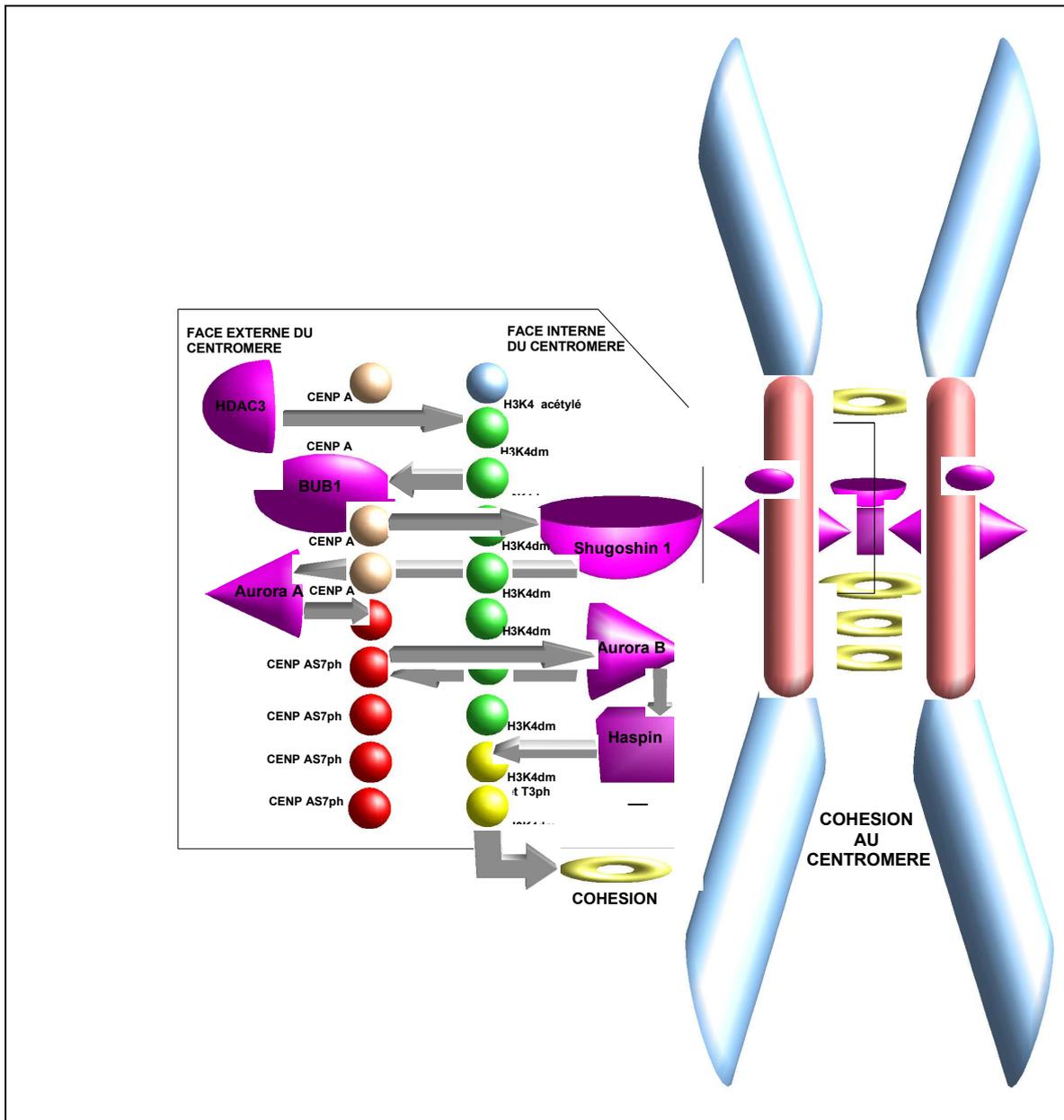


Figure 26 : Cascade de réaction envisagée et testée au cours du stage du modèle de voie de transduction du signal de la cohésion au centromère du chromosome métaphasique. HDAC 3 déacétyle H3K4 afin de permettre sa diméthylation. Cela permet le recrutement de BUB1 sur la face interne du centromère. BUB1 recrute alors Shugoshin. Sugoshin 1 permet le recrutement d'Aurora A sur la face externe. L'activité kinase d'Aurora A permet la phosphorylation de CENP A S7. Cette phosphorylation est entretenue par Aurora B sur la face interne du centromère. Cette localisation d'Aurora B permet la phosphorylation de l'Haspin qui phosphoryle H3 sur la thréonine 3.

3. Méthodologie de l'étude

Afin d'affirmer ou d'infirmer la validité de ce modèle, il a été décidé d'effectuer une déplétion par ARN interférence de chacune des protéines incluses dans le modèle. Le témoin négatif sera fourni par des cellules HeLa transfectées avec un siRNA anti Luciférase (siRNA LUC). Cette protéine étant naturellement absente des cellules HeLa, l'introduction du siRNA

LUC ne doit avoir aucun effet sur ces cellules. Toute modification de l'aspect des cellules transfectées siRNA Luc doit faire suspecter des artéfacts liés aux conditions expérimentales. Après un choc hypotonique, les cellules récoltées subiront un étalement chromosomique par cyto centrifugation. Un immunomarquage sera effectué pour chaque protéine (ou son substrat lorsque l'anticorps est inexistant) pour étudier, par immunofluorescence, le statut de chaque protéine pour chaque déplétion. Pour les marquages d'interprétation délicate, l'intensité du signal sera quantifiée et comparée au témoin négatif.

En parallèle, la qualité de la déplétion sera évaluée par Western Blot.

Chaque manipulation sera dupliquée. Les détails techniques sont présentés dans la section suivante : Matériels et Méthodes.

Matériels et Méthodes

I. Culture cellulaire

1. Lignée cellulaire

Les cellules HeLa S3 dérivant d'un adénocarcinome du col utérin sont le modèle cellulaire utilisé au laboratoire. Historiquement, ces cellules ont été prélevées sur Mme Henrietta Lakes en 1951. Ce sont les premières cellules humaines à avoir été mises en culture.

Sur ce modèle, deux lignées transfectées de manière stable ont été préétablies. La lignée HA-WT exprime la protéine HA-CENP A (c'est-à-dire, la protéine Cenp A fusionnée en C terminale avec l'étiquette HA). Cette lignée sera utilisée en qualité de témoin. La lignée HA-S7A, exprime quant à elle la protéine HA-CENP A S7A (une version mutée de CENP A où la serine 7 est substituée en alanine). Dans ces deux lignées, la séquence codante a été intégrée dans un plasmide pcDNA3.1, qui présente un promoteur CMV et un gène de résistance à la généticine (G418).

2. Culture et entretien

Les cellules sontensemencées de manière à atteindre entre 70 et 80% de confluence le jour de la récolte. Elles sont entretenues dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium-glutamaxTM, GIBCO). Ce milieu est complété à hauteur de 10% par du sérum de veau fœtal (SVF) fourni par la société PAA et décomplémenté 30 min à 56°C. Ce milieu contient par ailleurs 1% de PenstrepTM (GIBCO), qui est composé de pénicilline (10 000 unités par ml) et de streptomycine (10 mg par ml). Les lignées stables sont entretenues dans un milieu identique contenant du G418 à une concentration de 1mg/ml.

La récolte s'effectue après rinçage au PBS et les cellules sont individualisées après action de la Trypsine-EDTA (GIBCO).

L'incubation se fait à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

3. Isolement de clones WT et S7

Les cellules sont isolées par dilution limite (0,2 cellule par puits) sur plaque 96 puits (200 µl/puits). Les clones sont récoltés à 30% de confluence etensemencés dans des plaques 6 puits. A 70% de confluence, 50 000 cellules sont prélevées afin d'analyser l'expression des protéines HA-CENP A et HA-CENP A S7A par western blot. Les clones retenus sont ceux présentant une expression d'HA-CENP A comparable à l'expression du CENP A endogène.

4. Transfection de siRNA

400 000 cellules sontensemencées par puits (plaque 6 puits) pour un volume final de 2,5 ml. Extemporément, 520 µl de milieu de transfection sont ajoutés. Celui-ci est composé de 6,5 pmol de siRNA, de 540 µl d'OptiMem™ (milieu de culture optimisé pour la transfection, GIBCO) et de 11 µl d'agent de transfection Hiperfect™ (Qiagen).

Le lendemain, les cellules sont resuspendues dans 4,5 ml de DMEM après incubation dans 500 µl de trypsine. Après l'ajout de 1 ml de milieu de transfection, les cellules sont distribuées dans deux puits d'une plaque 6 puits. En fonction des siRNA, le temps d'incubation varie de 24 à 72 heures à compter de la deuxième transfection. Les séquences, les fournisseurs et les temps d'incubation des différents siRNA utilisés sont présentés dans le tableau 1.

	Séquence sens	Fournisseur	temps
HDAC 3	CAGGCTATGGGTCAAGGCTAATTGTGCG GCTTCATAGGGTGTCC	Eurogentec	48 H
BUB 1	GGUUAUUUCAGACACGCCU	Applied biosystem	48H
AURORA A	AUGCCCUGUCUUACUGUCA		48H
CENP A	GCCCGAGGCCCGAGGAGU		72H
SHUGOSHINE 1	CAGUAGACCCUGCUCAGAA	Quiagen	24H- 48H
AURORA B	GUGAGUCUUGAGGAAUUC		48H
HASPIN	GGCAUCUGAUGCUGAAAAG	Applied biosystem	48H

Tableau 1 : tableau présentant les séquences des siRNA utilisé au cours des manipulations relatées dans ce mémoire, les fournisseurs ainsi que les temps d'incubation retenus.

II Western Blot

1. Lyse et extraction protéique

Après numération, les cellules sont centrifugées à 1 600 g pendant 5 minutes, rincées dans 1 ml de PBS, puis centrifugées à nouveau à 1 600 g durant 6 minutes. Le culot de cellules est alors lysé directement dans du Laemmli 1X (2 000 cellules/µl), puis congelé à -20°.

2. Composition des gels de polyacrylamide

Le Gel de séparation est composé d'Acrylamide/bisAcrylamide 37,5 :1 (SIGMA) 10% à 18%, de Tris-HCl pH 8,8 375mM, de SDS 0,1% (dodécylsulfate de sodium), d'APS 0,04% (ammonium persulfate)et de TEMED 0,1% (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine).

Les proportions d'Acrylamide/bisAcrylamide sont variables en fonction du maillage des gels souhaité, elles sont précisées dans le tableau 2.

Gel	5%	7.5%	10%	12%	15%	18%
Lower tris	2.5 ml					
Acrylamide 40%	1.2 ml	1.8 ml	2.4 ml	2.9 ml	3.6 ml	4.4 ml
H2O MQ	6.3 ml	5.7 ml	5 ml	4.6 ml	3.9 ml	3.1 ml
APS 10%	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl
Temed	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl	10µl

Tableau 2 : composition du gel de séparation en fonction du maillage choisi.

Le gel de concentration est composé d'Acrylamide/bisAcrylamide 37,5 :1 (SIGMA) 40%, de Tris-HCl pH 6,8 500mM, de SDS 0,1%, d'APS 0,04% et de de TEMED 0,1%

3. Electrophorèse

Après polymérisation, le gel est immergé dans du tampon de migration (Tris base 24 mM, glycine 190 mM, SDS 01%).

25 µl d'extrait protéique (environ 50 000 cellules) sont déposés. Par ailleurs, 5 µl de marqueurs de poids moléculaire (PageRuler™ Fermentas) sont déposés dans un puits.

La migration se fait à voltage constant (200 V) via un générateur Biorad Power-pac 300 HC™.

4. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le gel est apposé à une membrane de nitrocellulose Hybond C-Extra™ (Amersham Biosciences) entre deux buvards. L'ensemble est immergé dans du tampon de transfert : Tris base 50 mM, Glycine 39 mM, pH ajusté à 9,9 pour les protéines histones, ou neutre pour les protéines non histones.

Le transfert se fait à ampérage constant. Le temps de transfert est fonction de l'épaisseur du gel et de son maillage, de la masse de la protéine et de l'ampérage choisi (toujours fixé à 0,35 A dans le cadre des manipulations relatées dans ce document)

5. Révélation

Après transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, celle-ci est colorée au rouge Ponceau (rouge Ponceau 0,5%, acide acétique glacial 10%) pour contrôler la qualité du transfert. Après rinçage à l'eau, la membrane est saturée en protéines de lait écrémé dilué dans

du tampon de lavage (TrisHCl 10 mM pH8, NaCl 100 mM, Tween 20 0,2%) 30 min sous agitation.

La membrane est ensuite incubée en présence de l'anticorps primaire dilué dans du tampon de lavage pendant une nuit à 4°C sous agitation. Les dilutions des différents anticorps utilisés sont présentées dans le tableau 3.

Anticorps	Dilution WB	Dilution IF	Espèce	Fournisseur	Lot	Type
H3K4 dm	1/2000	1/3000	Rabbit	Sigma	D5692	polyclonal
BUB1	1/1000	1/100	Mouse	Sigma	B0561	monoclonal
Shugoshin1	-	1/1000	Rabbit	Dont du Dr Watanabe	-	polyclonal
Aurora A	-	1/400	Mouse	Abcam	Ab13824	monoclonal
CENP-A s7ph	1/1000	1/1000	Rabbit	Millipore	04-792	monoclonal
Aurora B	-	1/400	Mouse	BD biosciences	611083	monoclonal
AuroraB	1/1000	-	Goat	Santa Cruz	Sc14326	polyclonal
H3T3ph	1/1000	1/3000	Rabbit	Abcam	Ab17352	polyclonal
CREST	1/1000	1/20000	Human	Dont service Hématologie CHRU Rennes		polyclonal
H3S10ph	1/2000	1/20000	Rabbit	Upstate	28770	polyclonal
HA	-	1/100	Rat	Roche	1867431	monoclonal
HDAC 3	1/5000	1/500	Rabbit	Sigma	H3034	polyclonal
Actin	1/1000	-	Rabbit	Sigma	A5060	polyclonal
HA-HRP	1/500	-	Rat	Roche		monoclonal

Tableau 3 : liste des anticorps primaire utilisé en Western Blot (WB) et en immunofluorescence (IF)

Après incubation, la membrane est rincée 3 fois 5 min sous agitation dans le tampon de lavage. Après une nouvelle saturation au lait, la membrane est incubée sous agitation en présence de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort, à température ambiante et durant 45 min. Les différents anticorps secondaires et leurs dilutions respectives sont mentionnés dans le tableau 4.

Anticorps	Couplé à	Raised in	IF	Blot	Fabricant
RABBIT	HRP	Donkey		1/ 25 000	Jackson
RABBIT	TRITC	Donkey	1/250		Jackson
RABBIT	TRITC	Goat	1/250		Jackson
RABBIT	FITC	Goat	1/250		Jackson
RABBIT	FITC	Donkey	1/250		Jackson
RABBIT	Alexa 488		1/1000		Molec Probes
MOUSE	HRP	Donkey		1/5000	Uptima
MOUSE	TRITC	Goat	1/250		Jackson
MOUSE	FITC	Goat	1/250		Abcam
MOUSE	FITC	Donkey	1/250		Uptima
GOAT	HRP	Donkey		1/5000	Santa Cruz
GOAT	TRITC	Donkey	1/300		FluoProbes
	FITC	Donkey	1/300		FluoProbes
RAT	HRP	Donkey			Jackson
RAT	Alexa 488 (Green)	Goat	1/250		Molec Probes
RAT	FITC	Donkey	1/100		Jackson
RAT	Alexa 647 (Red)	Goat	1/1000		Molec Probes
RAT	Alexa 555 (Red)	Goat	1/1000		Molec Probes
HUMAN	HRP	Goat		1/5000	Jackson
HUMAN	TRITC	Goat	1/100		Jackson
CHICKEN	HRP	Donkey		1/10 000	Jackson
CHICKEN	FITC	Donkey	1/100		Jackson

Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires utilisé en Western Blot (WB) et en Immunofluorescence (IF) avec leurs dilutions respectives et leurs fournisseurs

La membrane est ensuite rincée 3 fois 5 min au tampon de lavage.

Enfin, la mise en évidence des protéines immunomarquées est assurée par chimiluminescence (kit ECL-Amersham biosciences) conformément aux instructions du producteur. Les temps d'exposition des films photographiques sont adaptés extemporanément en chambre noire en fonction de la quantité de protéines. Les films sont révélés et fixé.

III. Immunofluorescence

1. Récolte de cellules

Le surnageant de milieu de culture pouvant contenir des cellules en division est conservé et les cellules adhérentes sont récoltées après action de la trypsine-EDTA. Les cellules sont comptées, puis centrifugées à 1 600 g durant 5 minutes.

2. Choc hypotonique et cyto centrifugation

Le culot cellulaire est resuspendu à une concentration de 200 000 cellules.ml⁻¹ dans une solution de KCl 75mM et incubé pendant 10 min afin de subir un choc hypotonique (osmolarité de la solution de KCl : 150 mOsmol.l⁻¹).

300 µl de cette solution sont déposés par puits de double cytofunnel TM (Thermo-Shandon)

Les cellules sont alors étalées sur lame par cyto centrifugation (Cytospin TM, Thermo Shandon) à 100 g pendant 5 minutes.

3. Fixation et perméabilisation des membranes

Les échantillons sont fixés pendant 20 min dans du PBS (GIBCO), PAF 3% (paraformaldéhyde). Après deux rinçages au PBS, les fonctions aldéhydes du PAF sont saturées 15 min dans une solution de Glycine (PBS, Glycine 100 mM). Les membranes cellulaires sont ensuite perméabilisées 15 min dans du PBS, Triton X100 0,2%.

La saturation de la lame, d'une durée d'une heure, est effectuée dans du PBS, SVF 5% après deux rinçages au PBS.

4. Immunomarquage

Les anticorps primaires sont dilués dans du PBS, SVF 5% et déposés sur les échantillons (50 µl par échantillon). L'incubation se fait sur la nuit à 4°C dans une chambre humide. Les différentes dilutions et les anticorps sont présentés dans le tableau 3.

Les lames sont ensuite rincées au PBS par trois bains successifs de 3 min et de nouveau saturées une heure au PBS, SVF 5%.

Les anticorps secondaires marqués par un fluorophore sont dilués dans du PBS, SVF 5% et déposés sur les échantillons. L'incubation se fait à température ambiante durant une heure. Les anticorps secondaires utilisés sont Alexa fluor 488 et 555 (anti-lapin ou anti-souris selon l'anticorps primaire utilisé) à la dilution de 1/1000 (Molecular Probes) et anti Human TRITC à la dilution de 1/100 (Jackson)

Après trois rinçage au PBS, une contre coloration nucléaire est réalisée au DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole, Sigma D9542) (1 ng.ml⁻¹ en PBS) durant 5 min.

Après un rapide rinçage au PBS, les lames sont montées au Mowiol, puis stockées à 4°C et à l'abri de la lumière.

IV. Microscopie en épifluorescence

1. Matériel

Les opérations de microscopies sont effectuées sur un microscope Leica DMRXA (plateforme de microscopie IFR 140) doté de filtres pour l'émission de la fluorescence DAPI, Fluoresceine Iso Thio Cyanate (FITC) et Tetra methyl Rhodamine Iso Thio Cyanate (TRITC).

2. Méthode

Les indices mitotiques sont établis par le compte des mitoses observables rapporté au nombre de cellules sur 40 champs microscopiques consécutifs.

Le taux de chromatides sœurs séparées de manière précoce est établi par le compte de 250 mitoses.

L'acquisition d'images se fait par le biais du logiciel MetamorphTM (Molecular devices), ces images seront traitées par le logiciel libre ImageJ.

Les quantifications ont été réalisées par Laura Magnaghi-Jaulin en isolant les kinétochores par différents masques. La fluorescence du signal CREST ou HA est mesurée, puis celle de la protéine d'intérêt. Le rapport de ces deux valeurs est ensuite établi.

V. Financement

1. Coût marginal

Le coût marginal des manipulations correspond au coût de production d'une manipulation. Il comprend pour les expériences relatées dans ce mémoire : le prix du matériel de culture cellulaire et le petit matériel de laboratoire (acheté en commun au sein de l'UMR 6061), ainsi que le prix des réactifs spécifiques (anticorps, siRNA...) acheté par l'équipe épigénétique et cancer. Il est estimé à 10 000€ dans le cadre de ce projet.

3. Coût complet

Le coût complet est défini comme la somme de l'ensemble des ressources mobilisées pour conduire le projet. Il comprends : le coût marginal, le salaire et les frais de fonctionnement de l'unité . Ces frais généraux de fonctionnement de l'unité il est établi par le CNRS et à pour valeur 0,8 x (coût marginal + salaire).

Ayant perçu une gratification de stage d'une valeur de 3600€ on peut évaluer le coût complet de ce projet à : $(10\ 000+3600) \times 1,8 = 24\ 480\text{€}$

4. Financement du stage

a. financement du projet

Ce projet à été financé par la « Ligue contre le cancer » et l' « ARC » pour la partie à la charge de l'équipe. Les frais de fonctionnement de l'unité étant assuré par le CNRS et l'Université de Rennes 1.

b. Revenu du stagiaire

La gratification de stage a été versée par le Canceropôle Grand-Ouest.

La politique local du Fongecif Bretagne visant à favoriser les personnes non diplômée il ne m'a pas été possible de bénéficier d'un congé individuel de formation pour ce stage. Afin de pouvoir obtenir un revenu suffisant, pour pouvoir louer un logement et assurer la subsistance de ma famille, j'ai créé une microsociété de conseil en diagnostic cytologique. Cette société bénéficiant du statut d'auto entrepreneur m'a permis en dehors de mon temps de stage d'assurer à domicile la lecture de frottis cervico-utérin de dépistage du cancer du col. Mes clients étaient des cabinets médicaux (dont mes anciens employeurs). Cette activité m'a permis de bénéficier d'un revenu stable au cours du stage et c'est poursuivi au cour de l'année qui l'a suivie dans l'attente de retrouver un emploi stable. Je continue par ailleurs à exercer cette activité.

Résultats

I. Déplétion de HDAC 3

Les déplétions d'HDAC 3 ont été réalisées sur 72 heures. Une étude cinétique de l'influence du temps de déplétion sur la prévalence du phénotype en fonction du temps d'incubation du siRNA a été effectuée par mes soins.

1. Aspect général

Les lames d'immunofluorescences étudiées présentaient dans leur ensemble une bonne population cellulaire. Les cellules interphasiques observées ne montraient pas d'anomalies cytologiques notablement différentes de celles observées sur les cellules témoins transfectées avec le siRNA LUC (Figure 26). Les cellules déplétées présentant un phénotype de PSCS montrent soit des chromatides fortement condensées et nettement séparées les unes des autres, soit des chromatides séparées au centromère, mais qui restent morphologiquement normales.

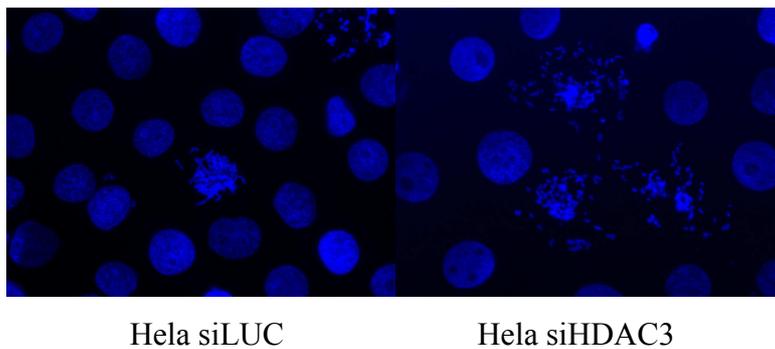


Figure 26 : à gauche étalement de cellules témoin, à droite, étalement de cellules déplétées HDAC 3. (Dapi x400).

2. Indice mitotique et PSCS

L'indice mitotique des cellules transfectées Luciférase reste constant quelque soit le temps d'incubation du siRNA (qui a été testé sur 24,48 et 72 h). Il se situe à 2,3% (+/- 0,23, n=3026). L'indice mitotique des cellules déplétées en HDAC3 évolue en fonction du temps d'incubation. Il est de 10,3% (+/-0,54 n=1257) pour une incubation de 24 h, pour atteindre 15,2% (+/-1,03 n=843) à 72 h. Une incubation de 96 h ne permet pas d'améliorer la pénétrance du phénotype avec un indice mitotique de 14,3% (+/- 0,76 n=720).

Le pourcentage de chromatides sœurs séparées précocement est, pour les cellules témoins, de 0,49% (+/-0,49, n=199). Les cellules transfectées siHDAC3 montrent quand à elles à 72 h un taux de PSCS de 26,03% (+/- 0,14, n=244).

3. Données d'immunofluorescence

a. Marquage H3S10ph

Le marquage H3S10ph est utilisé pour montrer les cellules n'ayant pas franchi le checkpoint de la mitose. Pour cet anticorps, les cellules déplétées HDAC3 présentant le phénotype de PSCS montrent un marquage constant et comparable au témoin négatif (Figure 27).

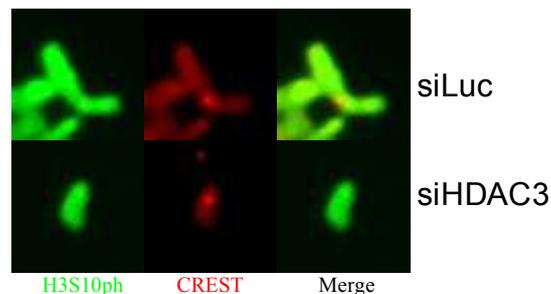


Figure 27 : **Marquage d'H3S10ph lors de la déplétion d'HDAC 3** : Marquage H3s10ph en vert, marquage du kinétochore en rouge par le CREST. Ligne du haut, cellules témoins ligne du bas déplétion HDAC3. (x1200)

b. Marquage H3K4dm

Le marquage de la diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est présent au centromère des cellules transfectées luciférase. Il est absent des cellules transfectées si HDAC3 présentant le phénotype PSCS comme l'avais montré précédemment l'équipe (Eot-Houllier *et al.*, 2008) (figure 28).

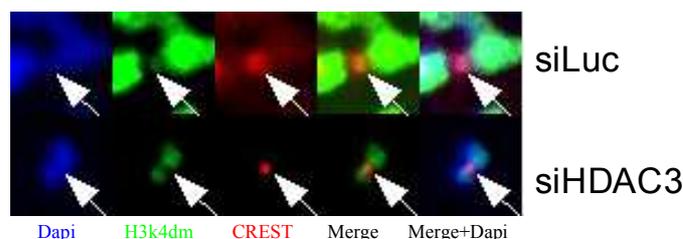


Figure 27: **Marquage d'H3K4dm lors de la déplétion d'HDAC 3**: Marquage H3K4dm en vert, flèche au niveau du marquage centromérique en rouge par le CREST. Ligne du haut, cellules HeLa transfectées si Luc et en bas cellules transfectées siHDAC3. (x1200)

c. Marquage BUB1

Sur le témoin, le marquage BUB1 se présente sous la forme de deux points superposables au marquage du kinétochore par le CREST. On retrouve sur les cellules transfectées siHDAC3 ce même marquage. Il est toutefois de moindre intensité (Figure 28).

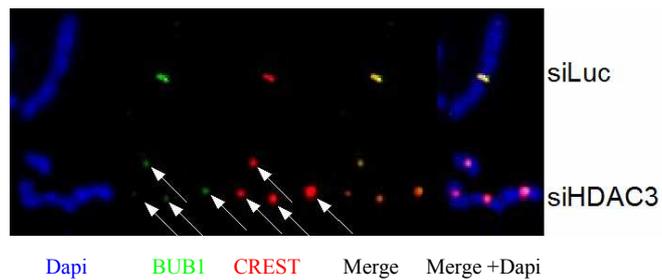


Figure 28 : **Marquage de BUB1 lors de la déplétion d'HDAC 3:** Immunomarquage de la protéine BUB1 en vert, le kinétochore est localisé par le CREST (en rouge). Ligne du haut, cellules témoins, ligne du bas, cellules déplétées en HDAC3 (flèches). (x1200)

Une quantification du signal BUB1 a été effectuée par Laura Magnaghi-Jaulin en réalisant le rapport intensité de fluorescence BUB1/intensité de fluorescence CREST. 154 kinétochores ont été quantifiés pour le témoin et la déplétion. Cette quantification montre une diminution d'un facteur 5 du signal BUB1 au centromère (Figure 29).

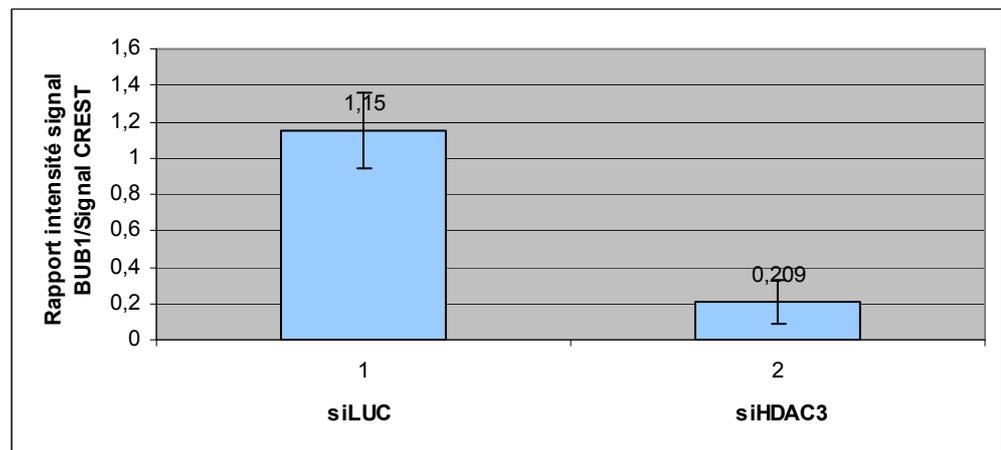


Figure 29 : Quantification de la fluorescence de BUB1 dans la déplétion HDAC3.

d. Marquage Shugoshin1

Le marquage Shugoshin 1 est présent au centromère des cellules témoins, il est par contre absent des cellules déplétées HDAC3 présentant le phénotype PSCS (Figure30).

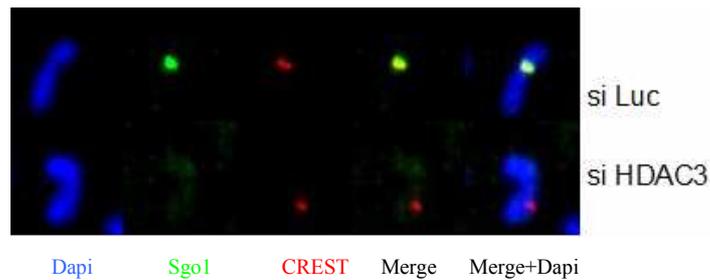


Figure 30 : **Marquage de la Shugoshin 1 lors de la déplétion d'HDAC 3:** Immunofluorescence montrant la disparition du signal Shugoshin1 en vert, au centromère localisé par le CREST en rouge. Ligne du haut cellules témoins, ligne du bas dans le cadre d'une déplétion HDAC3.(x1200)

e. Marquage Aurora A

Le marquage Aurora A semble persister au centromère des chromatides des cellules déplétées HDAC3 (Figure 31).

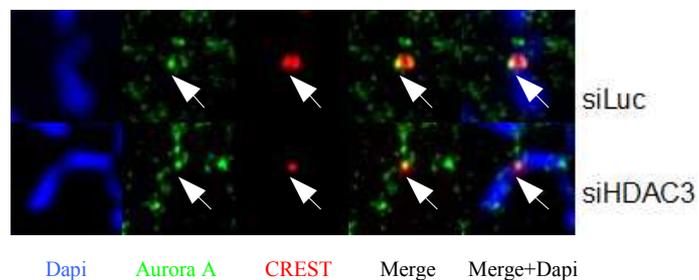


Figure 31 : **Marquage d'Aurora A lors de la déplétion d'HDAC 3 :** Marquage Aurora A en vert, marquage du kinétochore en rouge, chromatine en bleu. En haut témoin négatif, en bas déplétion HDAC3. (x1200)

La quantification de la fluorescence effectuée suivant la même procédure que pour BUB1 permet de dégager une diminution d'intensité de signal d'un facteur 7 entre les cellules déplétées HDAC3 par rapport au témoin (Figure 32).

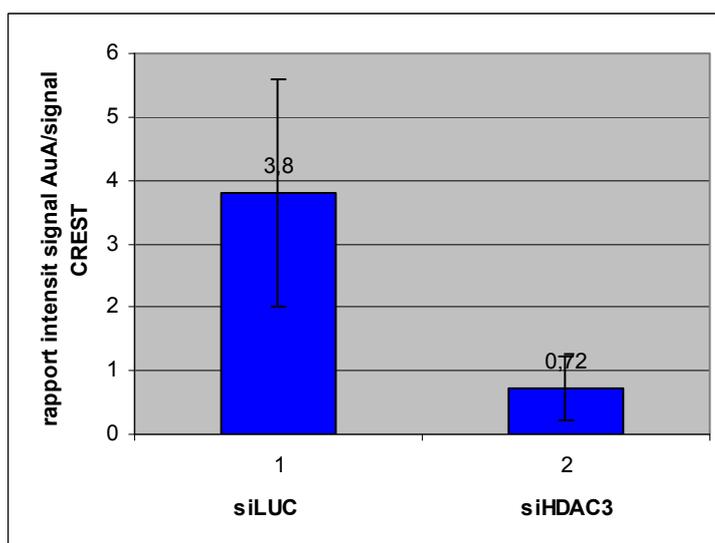


Figure 32 : Diagramme montrant la nette diminution du rapport intensité de fluorescence Aurora A/CREST dans des cellules déplétées en HDAC3 par rapport aux cellules témoins.

f. Marquage CENP A S7ph

Au microscope, le marquage CENP A S7ph paraît diminué dans les cellules déplétées pour HDAC3 (Figure 33). Toutefois, les données de quantification ne montrent qu'une diminution de 30% du signal. D'une manière générale, la qualité du signal CENP A S7ph fourni par l'anticorps utilisé est ambiguë. Il est nécessaire de tester de nouvelles conditions expérimentales pour éclaircir le statut de la phosphorylation de CENP A S7ph pour toutes les déplétions.

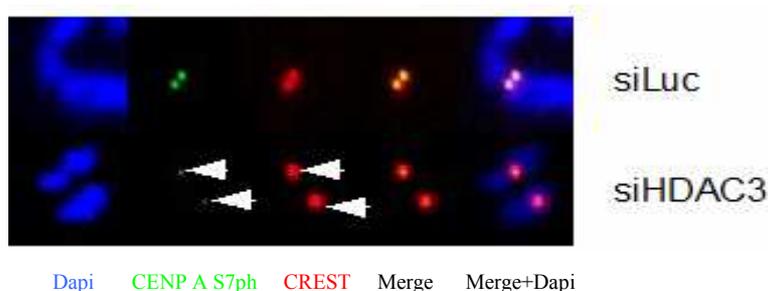


Figure 33 : **Marquage de CENPA S7ph lors de la déplétion d'HDAC 3** : Marquage CENPA S7ph en vert, kinétochore en rouge, chromatine en bleu. Les cellules témoins sont représentées ligne du haut, le cas de la déplétion HDAC3 sur la ligne du bas.(x1200)

g. Marquage Aurora B

Le marquage Aurora B est localisé au centromère des cellules témoins. Par contre, sur les cellules déplétées en HDAC 3, le marquage est diffus, voire absent sur l'ensemble de la chromatide (figure 34).

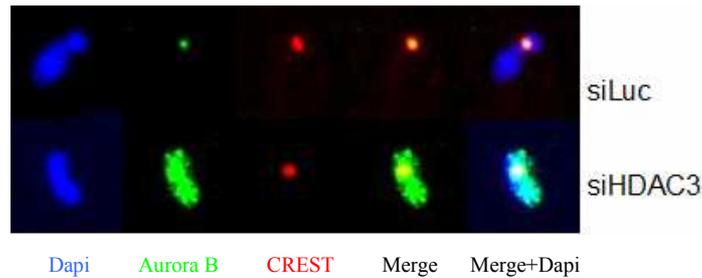


Figure 34 : **Marquage d'Aurora B lors de la déplétion d'HDAC 3**: Marquage d'Aurora B en vert, du kinétochore en rouge et de la chromatine en bleu. Les chromatides PSCS des cellules déplétées en HDAC3 sont présentées ligne du bas, le témoin en haut. (x1200)

h. Marquage H3T3ph

De manière similaire au marquage Aurora B, le marquage H3T3ph (témoin de l'activité kinase de l'haspin) est relocalisé sur l'ensemble de la chromatide sur les cellules déplétées (Figure 35).

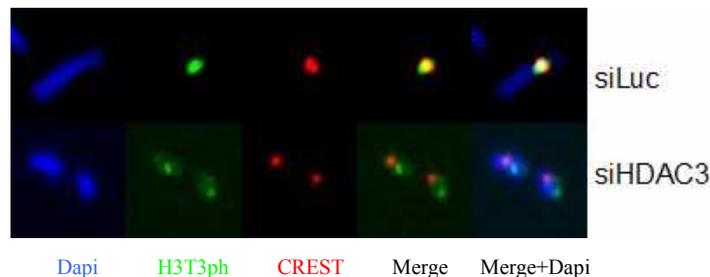


Figure 35 : **Marquage d'H3T3ph lors de la déplétion d'HDAC 3** : Marquage H3T3ph en vert, marquage du kinétochore en rouge et de la chromatine en bleu. Les clichés présentent sur la ligne du haut le témoin négatif, sur la ligne du bas la déplétion HDAC3. (x1200)

II. Déplétion de BUB1

1. Aspect général

Les lames réalisées sont dans l'ensemble similaires et l'on ne reconnaît pas de différence morphologique parmi les cellules interphasiques (Figure 36). Les cellules en mitose déplétées en BUB1 présentent des chromosomes ayant une morphologie différente. Sur ces cellules, les chromatides semblent être moins condensées et on note la disparition du point de constriction au centromère (figure 37).

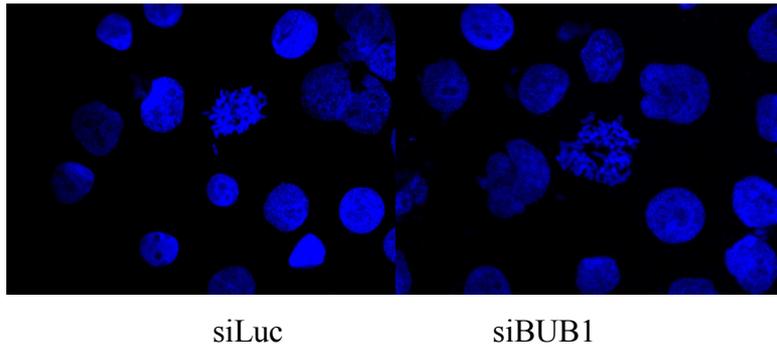


Figure 36 : Marquage de la chromatine par le DAPI présentant la déplétion témoin à gauche et la déplétion de la protéine BUB1 à droite. (x400)

2. Indice mitotique et PSCS

Les indices mitotiques sont similaires entre les cellules témoins (3%, n=1473) et les cellules déplétées (3%, n=2093).

De même, il n'a pas été constaté une influence majeure de la déplétion de BUB1 sur l'apparition d'un phénomène de PSCS : 1,5%, n=401 pour le témoin, 2,6%, n=308 pour la déplétion BUB1.

Par contre, il a été constaté que la distance entre les kinétochores était augmentée de manière significative dans 22% des mitoses. Celle-ci, mesurée en pixel, est de 12 pixels pour les cellules témoins (19 centromères quantifiés) et de 21 pixels pour les mitoses présentant ce phénotype de séparation au centromère (79 centromères quantifiés pour 11 mitoses présentant ce phénotype) (Figure 37)

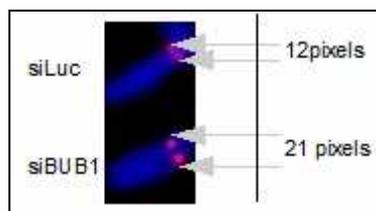


Figure 37 : Distance entre les kinétochores dans les cellules témoins et les cellules déplétées BUB1 présentant le phénotype de distance « interkinétochore » augmentée. On peut noter la disparition du point de constriction au centromère. (x1200)

3. Données d'immunofluorescence

a. Marquage H3S10ph

Le marquage H3S10ph est constant et d'une intensité comparable entre les cellules témoins et déplétées. Il est présent de manière identique sur les chromosomes ayant une distance interkinétochore augmentée (Figure 38).

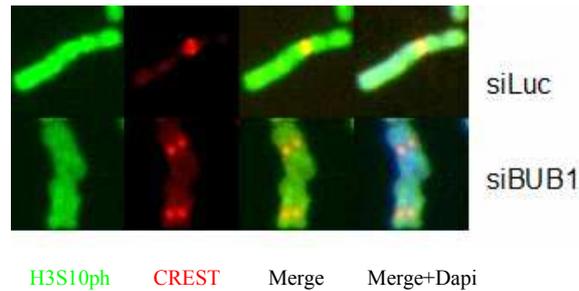


Figure 38 : **Marquage d'H3S10ph lors de la déplétion de BUB1** : Marquage H3S10ph en vert, du kinétochore en rouge sur les cellules témoins en haut et sur des cellules déplétées BUB1 en bas.(x1200)

b. Marquage H3K4dm

Le marquage H3K4dm est présent sur certains centromères sur les chromosomes des cellules témoins et déplétées. La quantification de la fluorescence n'a pas montré de différence d'intensité de signal entre les deux préparations (Figure 39).

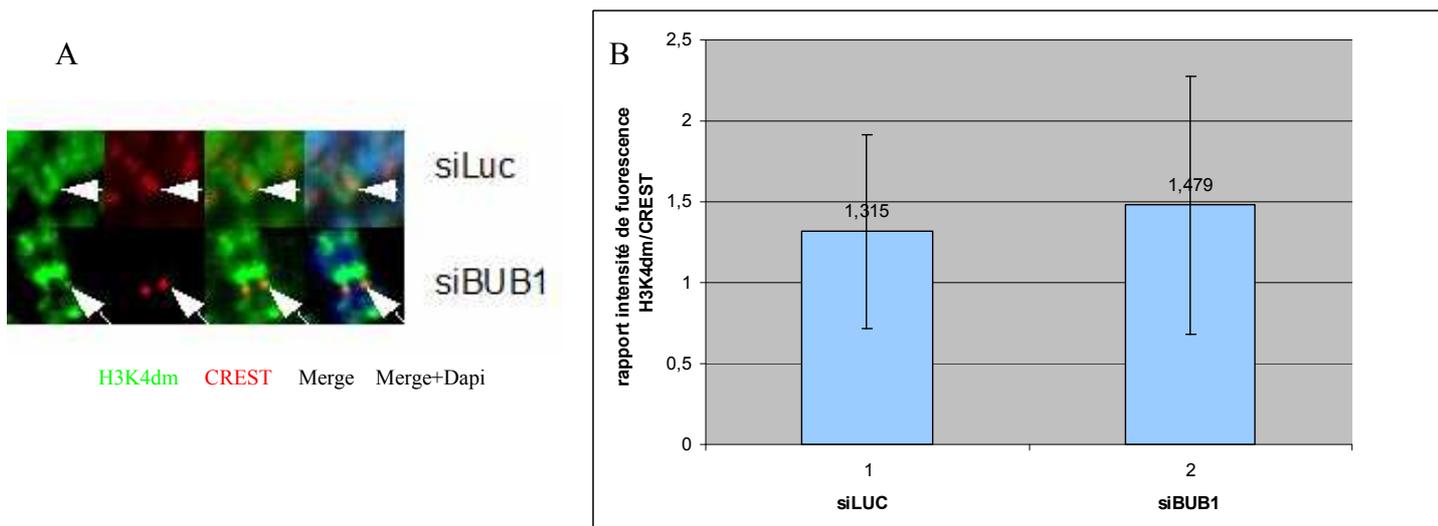


Figure 39: **Marquage d'H3K4dm et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de BUB1** : A : Marquage H3K4dm en vert sur la déplétion BUB1 (ligne du haut témoin négatif, ligne du bas déplétion BUB1). Les kinétochore sont localisés par le CREST en rouge, la chromatine par le DAPI en bleu. B Le rapport intensité du signal H3K4dm/CREST reste comparable dans les deux cas (siLuc témoin négatif, siBUB1 déplétion de la protéine BUB1)

c. Marquage BUB1

Le marquage BUB1 est non visible dans les cellules déplétées en BUB1. Cela témoigne d'une bonne efficacité de l'extinction de la protéine par le siRNA (Figure 40). Cette extinction n'a pas été évaluée par Western Blot en raison de difficultés techniques.

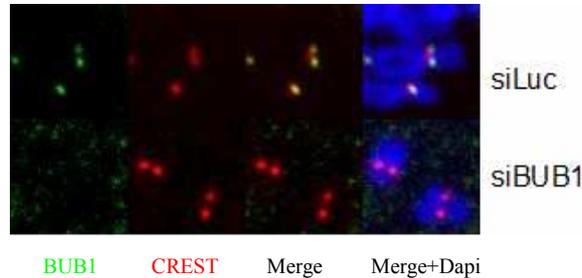


Figure 40 : **Marquage de BUB1 lors de la déplétion de BUB1** : Marquage de BUB1 en vert, du kinétochore en rouge par le CREST et de la chromatine en bleu par le DAPI (si Luc déplétion témoin, siBUB1 déplétion BUB1). (x1200)

d. Marquage Shugoshin1

Comme attendu dans le modèle que l'on tente de démontrer, le marquage Shugoshin 1 est fortement diminué voir absent des cellules déplétées en BUB1 (Figure 41).

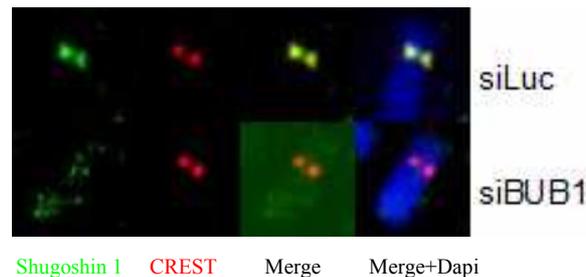


Figure 41: **Marquage de la Shugoshin 1 lors de la déplétion de BUB1** : Le marquage Shugoshin 1 en vert CREST en rouge et DAPI en bleu. Sur la ligne du haut on observe les chromatides d'une cellule témoins et sur la ligne du bas les chromatides d'une cellules déplétées en BUB1. (x1200).

e. Marquage Aurora A

Ce marquage est très délicat à interpréter sur cette déplétion. Il semble que la déplétion de BUB1 ne permet pas à Aurora A de se localiser convenablement au centromère (Figure 42). Les données de quantification montrent une nette diminution du signal au centromère. Le rapport intensité signal Aurora A/intensité signal CREST est de 0,98 pour le témoin et 0,14 dans le cadre d'une déplétion BUB1.

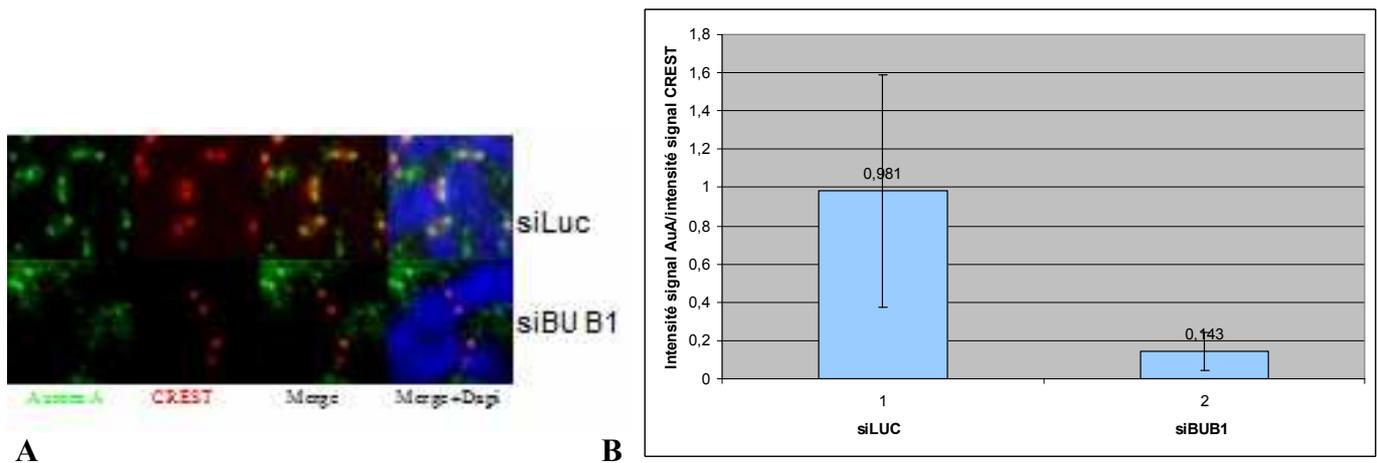


Figure 42: **Marquage d'Aurora A et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de BUB1** : En A : immunomarquage d'Aurora A en vert, du kinétochore en rouge et de la chromatine en bleu. La ligne du haut présente le témoin, celle du bas la déplétion de BUB1. En B, quantification du rapport signal Aurora A/signal CREST (siLuc témoin négatif, siBUB1 déplétion de BUB1)

f. Marquage CenpAS7ph

L'anticorps anti CENP A S7ph ayant perdu de son efficacité au cours du stage (problème de conservation), les résultats de ce marquage pour cette déplétion réalisée en fin de stage ne sont pas présentables. Les résultats obtenus au préalable montrent une diminution du signal CENP A S7ph.

g. Marquage Aurora B

Comme dans le cas de la déplétion HDAC3, Aurora B est délocalisée sur l'ensemble de la chromatide lors de la déplétion BUB1. On ne note pas d'enrichissement de ce marquage au centromère la protéine semble uniformément répartie le long du chromosome. (Figure 43)

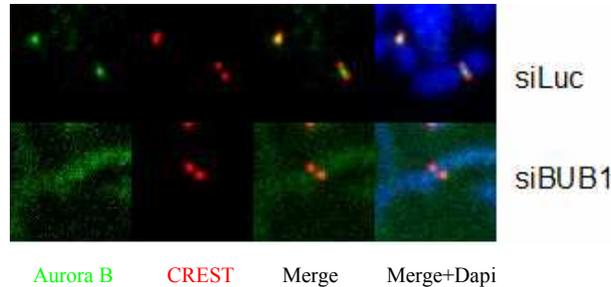


Figure 43: **Marquage d'Aurora B lors de la déplétion de BUB1** : Marquage Aurora B en vert, CREST en rouge et de la chromatine en bleu par le DAPI, (siLuc témoin négatif, siBUB1 déplétion de BUB1) (x1200)

h. Marquage H3T3ph

L'activité de l'Haspin est maintenue dans la déplétion BUB1, mais comme dans la déplétion précédente, la protéine est délocalisée et le marquage se retrouve sur l'ensemble de la chromatide (Figure 44).

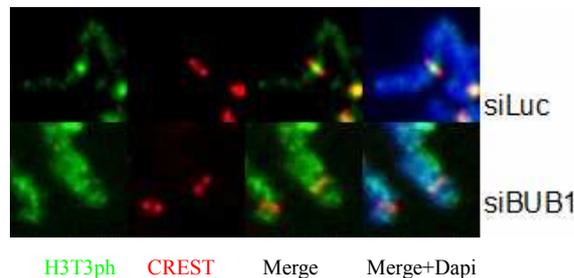


Figure 44 : **Marquage d'H3T3ph lors de la déplétion de BUB1** : Clichés montrant la localisation de l'activité de l'Haspin (marquage H3T3ph en vert) par rapport au kinétochore (marquage CREST en rouge) sur des chromatides (marquage de l'ADN par le DAPI), la ligne du haut présente des chromosomes d'une cellule témoin, la ligne du bas ceux d'une cellule déplétée BUB1. (x1200)

III. Déplétion de la Shugoshin 1

1. Aspect général

La déplétion de la Shugoshin 1 est réalisée sur 48h, contrairement aux autres déplétions réalisées sur 72 h. La déplétion, qui n'est pas évaluée en Western Blot en raison de la faible quantité d'anticorps disponible, conduit à une forte mortalité cellulaire, comme en témoigne les nombreux débris cellulaires présents sur les lames. Le phénotype de PSCS est massif et aisément identifiable. Les chromatides sœurs sont très nettement séparées et fortement condensées (figure 45).

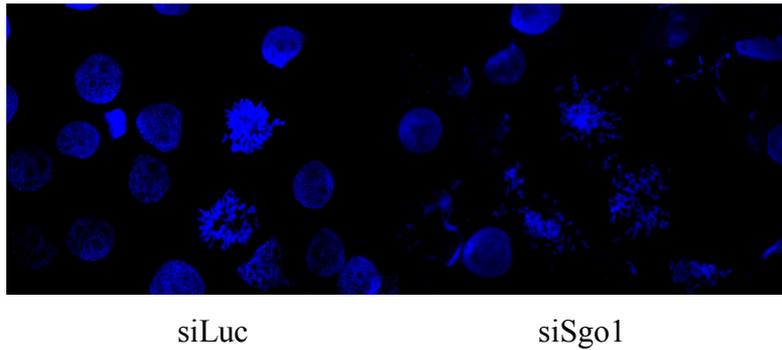


Figure 45 : microphotographie présentant le marquage de l'ADN par le DAPI sur des cellules témoins (à gauche) et sur des cellules déplétée en Shugoshin 1 (à droite).(x400)

2. Indice mitotique et PSCS

La déplétion de la Shugoshin 1 conduit à un arrêt du cycle cellulaire en mitose, comme en témoigne l'indice mitotique qui est fortement augmenté. Il atteint 44,2 %(+/-1,45 %, n=866) dans la déplétion contre 3,4 %(+/-0,4 %, n=3069) pour les lames témoins.

La Shugoshin 1 est connue comme étant la protéine majeure de la protection de la cohésion au centromère. En effet, au cours de ces manipulations, le taux de PSCS observé est très important et touche presque l'ensemble des mitoses observées. Il est de 93 %(+/- 1%, n=1082) pour les cellules déplétées Sgo1 contre 1,55 %(+/-0, 55%, n=788) pour les témoins.

3. Donnée de l'immunofluorescence

a. H3S10ph

Le marquage H3S10ph confirme que les cellules présentant un phénotype PSCS restent bloquées en mitose. Le marquage est présent sur l'ensemble des chromatides de manière similaire au témoin (Figure 46).

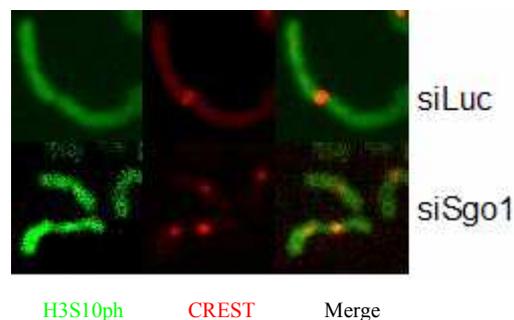


Figure 46 : **Marquage H3S10ph lors de la déplétion de la Shugoshin 1** : Le marquage H3S10ph est présenté en vert et le marquage du kinétochore en rouge. Sur la ligne du haut est représenté un chromosome d'une cellule témoin, sur la ligne du bas des chromatides PSCS lors de la déplétion SGO1.(x1200)

b. H3K4dm

Comme cela était prévu dans le modèle à tester, le marquage Shugoshin 1 persiste au centromère des chromatides séparées. Les données de la quantification abondent dans ce sens avec des valeurs pour le rapport intensité du signal H3K4dm/intensité du signal CREST de 1,5 pour la déplétion contre 1,1 pour le témoin (figure 47).

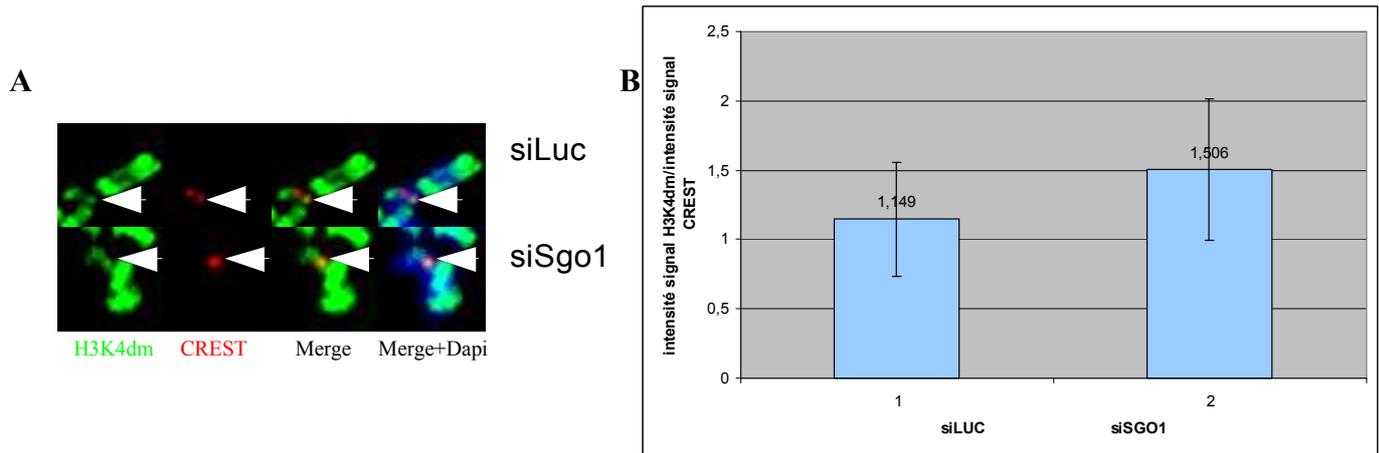


Figure 47 : **Marquage de H3K4dm et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de la Shugoshin 1** : A : le marquage H3K4dm est présenté en vert (les flèches ciblent le marquage centromérique) le kinétochore est marqué par le CREST (en rouge) et l'ADN est coloré par le DAPI. En B : Quantification du signal H3k4dm au centromère/signal CREST (siLuc : témoin négatif, si Sgo1 déplétion de Sgo1).

c. BUB1

Y. Watanabe, qui a découvert la Shugoshin, a montré que c'était BUB1 qui était responsable de la localisation de la Shugoshin et que la déplétion de cette dernière n'avait aucun effet sur la localisation de BUB1 (Kitajima *et al.*, 2004). Les manipulations effectuées dans le cadre de ce travail ne contredisent pas ce résultat. Le marquage BUB1 subsiste au centromère des chromatides PSCS (Figure 48).

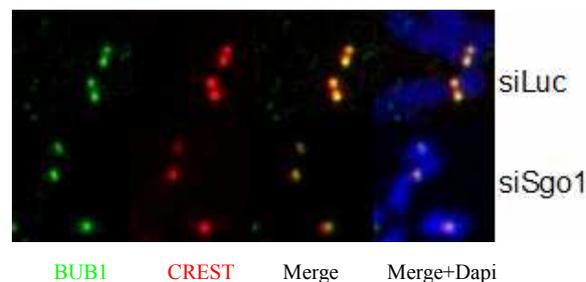


Figure 48: **Marquage de BUB1 lors de la déplétion de la Shugoshin 1** : marquage BUB1 en vert, CREST en rouge, ADN en bleu. La ligne du haut présente le témoin de transfection, la ligne du bas la déplétion de Sgo1.(x1200)

d. Shugoshin 1

Le marquage Shugoshin est utilisé comme témoin de la déplétion. Sa disparition atteste de la bonne qualité de la transfection (Figure 49).

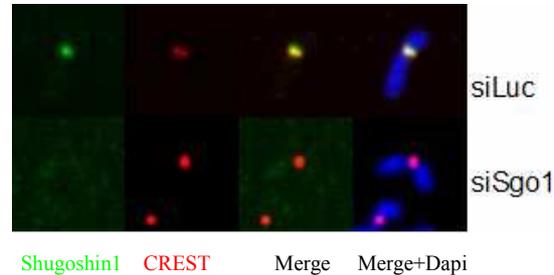


Figure 49: **Marquage de la Shugoshin 1 lors de sa déplétion** : Le marquage Shugoshin1 est coloré en vert, les kinétochore en rouge et l'ADN en bleu, la ligne du haut présente le témoin de transfection, la ligne du bas la déplétion de Sgo1.(x1200)

e. Aurora A

Le modèle testé suppose qu'Aurora A est localisée au centromère si Shugoshin 1 y est préalablement établie. Les manipulations préliminaires effectuées au laboratoire ayant permis de mettre en évidence Aurora A au centromère étaient souvent polluées par un important bruit de fond. C'est dans ce contexte qu'avait été supposé qu'Aurora A était localisée par la Shugoshin1. Les manipulations relatives dans ce mémoire ayant été effectuées dans de meilleures conditions techniques (conditions de stringence différente), il a été possible de mettre en évidence Aurora A au centromère dans les cellules déplétées en Shugoshin 1 (Figure 50). La quantification de la fluorescence met en évidence un rapport intensité du signal Aurora A/intensité signal CREST équivalent entre les centromères des cellules déplétées et ceux des cellules témoin.

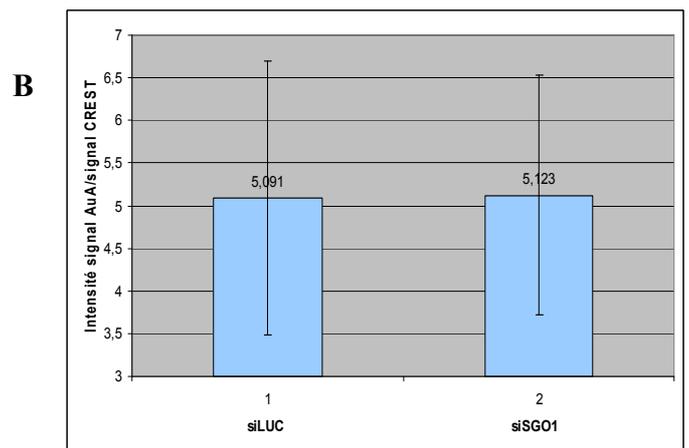
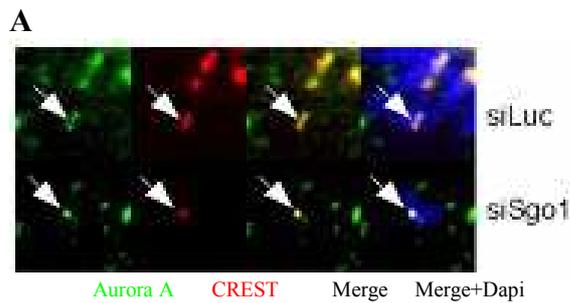


Figure 50: **Marquage d'Aurora A et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de la Shugoshin 1** : En A : microphotographie présentant l'immunomarquage d'Aurora A (en vert), des kinétochore en rouge, et de l'ADN en bleu, dans le cadre d'une déplétion de la Shugoshin1 qui est présenté sur la ligne du bas (la ligne du haut montrant le témoin négatif). En B : quantification du rapport entre les fluorescence des marquage Aurora A et CREST. (siLuc : témoin de transfection, siSgo1 déplétion de Sgo1)

f. CENP A S7ph

Le marquage CENP A S7ph qui était attendu diminué dans l'hypothèse ou Aurora A était délocalisée lors de la déplétion de la Shugoshin 1. Aurora A n'étant en fait pas délocalisée, le marquage CENP A S7ph reste présent. De plus, l'intensité de la fluorescence est comparable à celle du témoin (Figure 51).

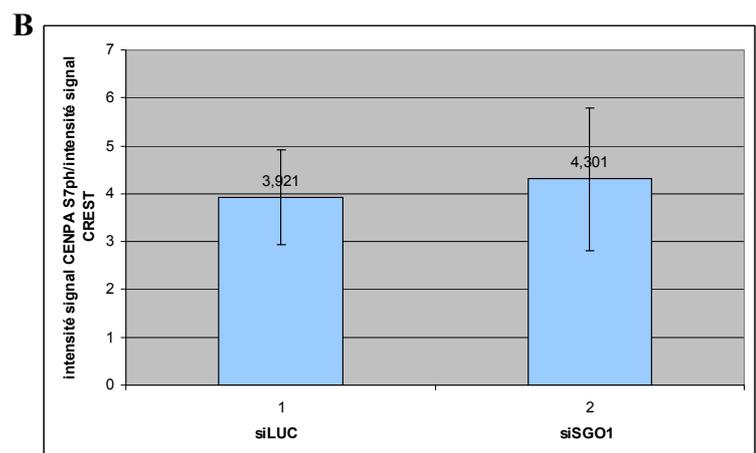
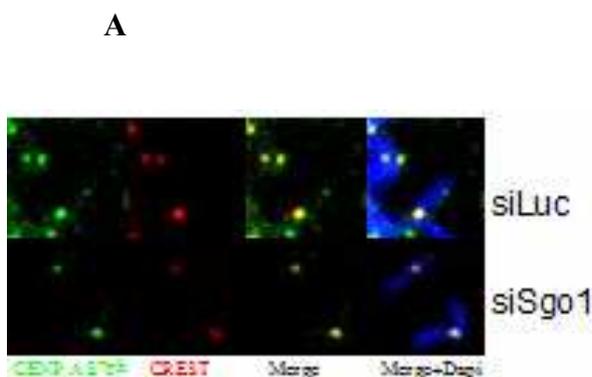


Figure 51: **Marquage de CENP A S7ph et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de la Shugoshin 1** : A Marquage en IF de la phosphorylation de CENP A S7 (en vert) lors d'une déplétion de Sgo1 (ligne du bas), le centromère est localisé par un marquage CREST (en rouge), l'ADN est colorée par le Dapi. (x1200)

B : La phosphorylation de la serine 7 de CENP A subsiste dans lors de la déplétion de la Shugoshin 1 dans des proportions comparables à celles des cellules témoins.

g. Aurora B

La protéine Aurora B perd sa localisation centromérique lors de la déplétion de la Shugoshin 1. Comme dans le cas des précédentes déplétions, Aurora B est repartie le long des chromatides (Figure 52).

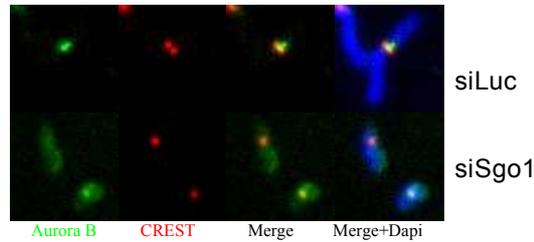


Figure 52 : **Marquage d'Aurora B lors de la déplétion de la Shugoshin 1** : Marquage d'Aurora B (en vert) lors d'une déplétion de Sgo1. Le CREST marque le centromère en rouge, et l'ADN est colorée par le Dapi en bleu. La ligne si Luc représente le témoin négatif de la manipulation, si Sgo 1 la des chromatides PSCS obtenues lors de la déplétion. (x1200)

h. H3T3ph

Comme Aurora B, le marquage H3T3ph conserve un aspect similaire à celui rencontré lors des précédentes déplétions. Il est soit absent, soit uniformément repartie sur la chromatide (Figure 53).

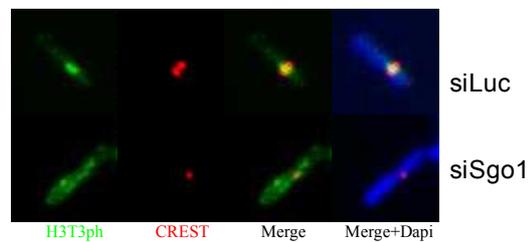


Figure 53 : **Marquage H3T3ph lors de la déplétion de la Shugoshin 1** : Le marquage H3T3ph (en vert) signe l'activité de l'Haspin. Les centromères sont spécifiés par le CREST (en rouge) et l'ADN est colorée par le Dapi (en bleu). La ligne du haut représente le témoin, celle du bas la déplétion de Sgo1. (x1200)

IV Déplétion d'Aurora A

1. Aspect général

Aurora A a de nombreuses fonctions en mitose. La transfection d'un siARN anti Aurora A (siAu A) conduit donc à l'obtention de nombreux phénotypes différents. Ainsi, on peut remarquer un nombre important de figures de mitose anormales. Le phénotype de PSCS est présent attribuant à Aurora A un rôle jusqu'alors méconnu dans la régulation de la cohésion au centromère au cours de la prométaphase (Figure 54).

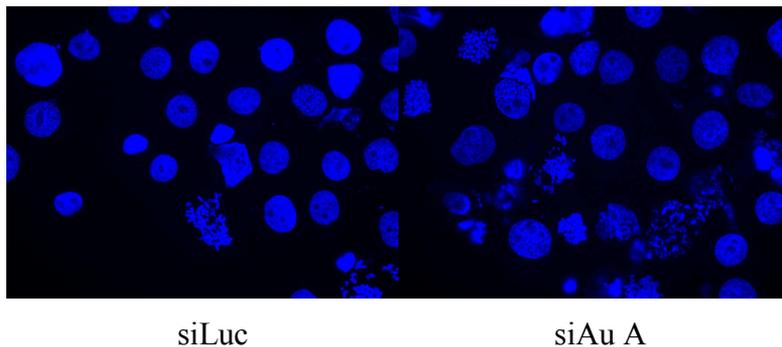


Figure 54 : La déplétion d'Aurora A engendre de nombreux phénotypes et une forte mortalité cellulaire, comme en témoignent les nombreux corps apoptotiques identifiables sur le fond de la préparation. Coloration de l'ADN par le Dapi, si Luc témoin négatif, si Au A déplétion d'Aurora A. (x400)

2. Indice mitotique et PSCS

La déplétion d'Aurora A conduit à une accumulation de cellules en mitose comme en témoigne l'augmentation de l'indice mitotique. Celui-ci est de 14,7 % (n=752) pour les cellules déplétées contre 3 % (n=843) pour le témoin. Le nombre de figures de mitose présentant le phénotype PSCS est de 15 % (n=468) contre 1,7 % (n=227) sur le témoin.

3. Données de l'immunofluorescence

a. Marquage H3S10ph

Le marquage H3s10ph reste présent sur une partie des cellules présentant des chromatides sœurs séparées, laissant supposer l'existence d'anaphases précoces. Seules ont été comptabilisées comme PSCS les figures de mitose présentant un marquage H3S10ph positif (Figure 55).

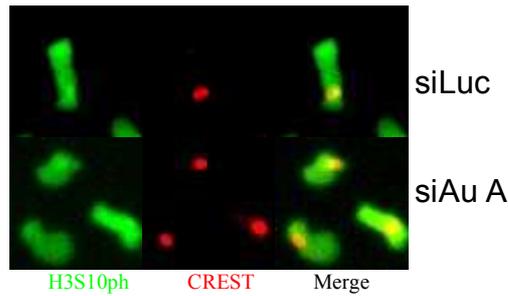


Figure 55 : **Marquage H3S10ph lors de la déplétion d’Aurora A** : Marquage en IF de la phosphorylation d’H3S10 (vert) du kinétochore en rouge par le CREST. si Luc témoin négatif, si Aurora A déplétion d’Aurora A. (x1200)

b. Marquage H3K4dm

Malgré les difficultés rencontrées pour mettre en évidence ce marquage au centromère au sein du témoin et de la déplétion, il a été possible de montrer la présence de cette modification comme attendu dans le modèle. La qualité des clichés des manipulations réalisées au cours du stage étant médiocre, seule les données de quantification seront présentées (Figure 56).

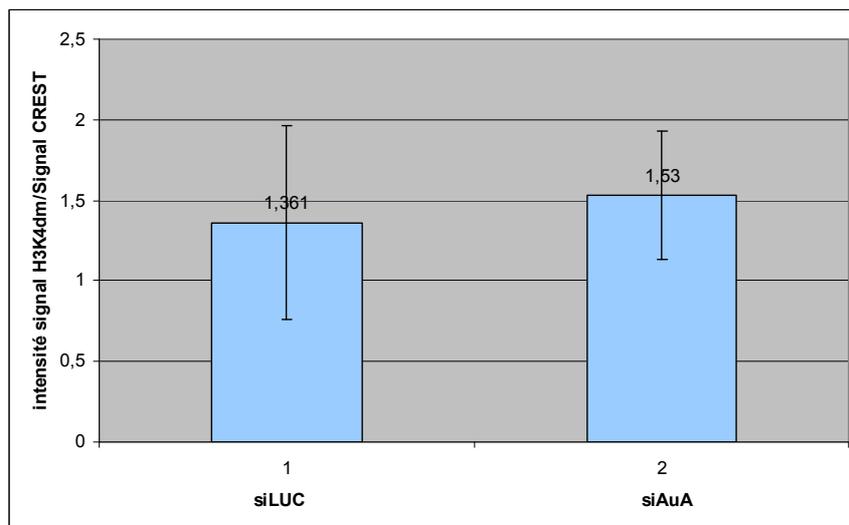


Figure 56 : La quantification du signal H3K4dm rapporté au signal CREST lors de la déplétion d’Aurora A (si AuA) et comparé au témoin (siLuc)

c. Marquage BUB1

La déplétion d’Aurora A ne délocalise pas BUB1 du centromère. Le marquage BUB 1 reste localisé au centromère et semble d’intensité équivalente à celle du témoin (Figure 57).

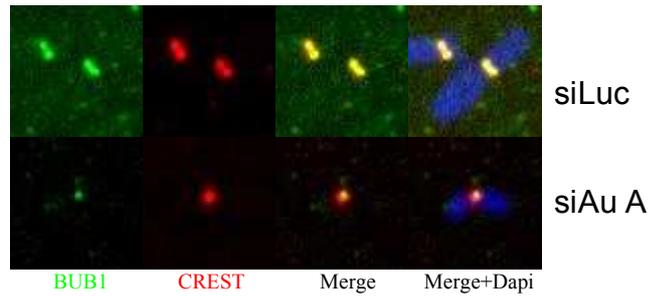


Figure 57 : **Marquage BUB1 lors de la déplétion d’Aurora A** : BUB1 est marquée en vert, le kinétochore par le CREST en rouge, et l’ADN est colorée par le Dapi. La ligne du haut représente ces marquages sur le témoin, la ligne du bas lors de la déplétion d’Aurora A. (x1200)

d. Marquage Shugoshin 1

La déplétion d’Aurora A n’a aucune incidence sur la localisation de la Shugoshin. Cette protéine est aisément mise en évidence en microscopie. L’établissement du rapport Signal Shugoshin 1/ Signal CREST ne montre pas d’écart significatif entre les kinétochores des cellules transfectées siLuciférase et celles transfectées siAurora A (Figure 58).

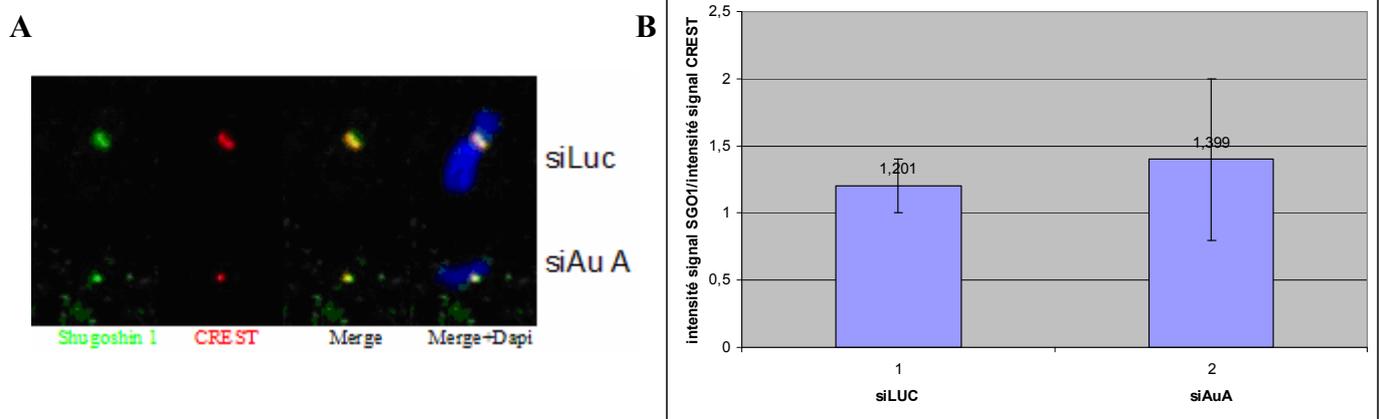


Figure 58 : **Marquage de la Shugoshin 1 et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion d’Aurora A** : A : La Shugoshin 1 est marquée en vert, le centromère est localisé par le CREST en rouge, L’ADN est coloré par le Dapi. La ligne du haut représente ces marquages sur le témoin, la ligne du bas lors de la déplétion d’Aurora A. (x1200)

B : L’intensité de fluorescence du marquage Shugoshin 1 est superposable d’un kinétochore témoin à un kinétochore de cellule transfectée siAu A.

e. Marquage Aurora A

Le signal Aurora A n'est pas visible dans les cellules, la quantification de la fluorescence permet de confirmer la bonne qualité de la déplétion qui n'a pas été évaluée par Western Blot au cours du stage (Figure 59).

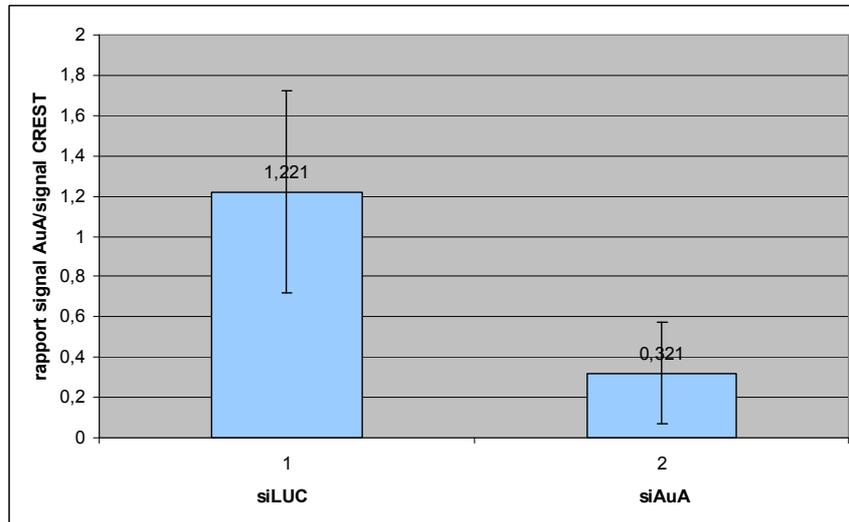


Figure 59 : Quantification du rapport intensité du signal Aurora A / Signal CREST lors de la déplétion d'Aurora A (siAuA) comparé à la déplétion témoin (siLuc)

f. Marquage CENP A S7ph

La quantification de la fluorescence du marquage CENP A S7ph, réalisée sur des manipulations effectuées par Laura Magnaghi-Jaulin, montre une diminution de 80,5 % du rapport CENP A S7ph/CREST lors de la déplétion d'Aurora A (Figure 60).

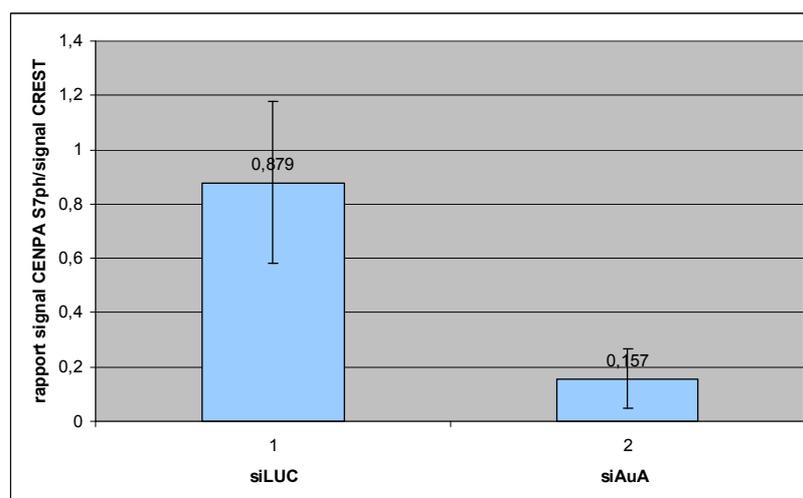


Figure 60 : Quantification de la fluorescence de CENPA S7ph par rapport à la fluorescence du signal CREST lors de la déplétion d'Aurora A.

g. Marquage Aurora B

A l'instar des autres déplétions, Aurora B est délocalisée lors de la déplétion Aurora A. Le signal tend à diffuser sur l'ensemble des chromatides (Figure 61) comme cela avait déjà été montré (Kunitoku et al) Il est par ailleurs parfois absent.

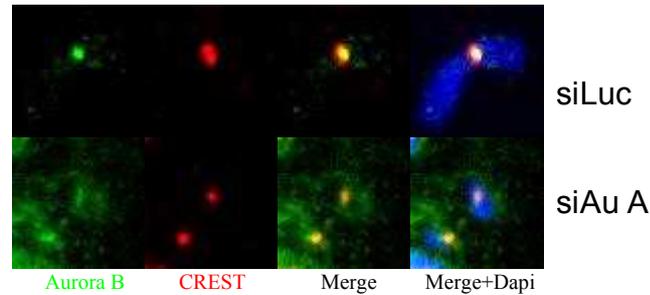


Figure 61 : **Marquage d'Aurora B lors de la déplétion d'Aurora A** : D'immunomarquage d'Aurora B en vert, des centromères (en rouge par le CREST) l'ADN est contre coloré par le Dapi. La ligne siLuc présente la manipulation témoin, la ligne siAu A la manipulation de déplétion d'Aurora A. (x1200)

h. Marquage H3T3ph

L'activité de l'Haspin, dont la phosphorylation de la thréonine de l'histone H3 est le témoin, est délocalisée sur les bras des chromosomes lors de la déplétion Aurora A (Figure 62). Cela est compatible avec le modèle testé qui suppose qu'Aurora B localise Haspin.

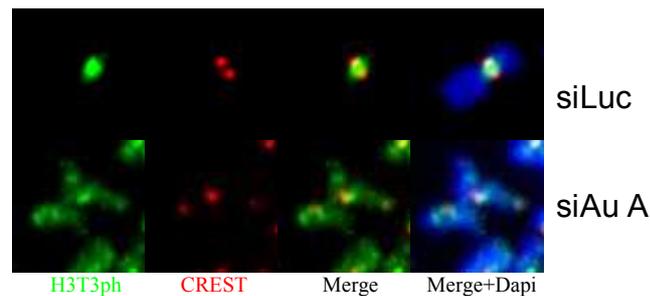


Figure 62 : **Marquage H3T3ph lors de la déplétion d'Aurora A** : Co-immunomarquage de la phosphorylation de H3T3 (en vert), des centromères (en rouge par le CREST). La ligne siLuc présente la manipulation témoin, la ligne siAu A la manipulation de déplétion d'Aurora A. (x1200)

V. Mutant HA-CENP A S7

1. Aspect général

Le mutant HA-CENP A WT transfecté siCENP A est utilisé dans ces manipulations en qualité de témoin négatif, afin d'exclure une éventuelle incidence de l'étiquette HA sur le comportement du CENP A tagué. Il est comparé dans toutes les manipulations avec la lignée HA-CENP A WT ayant subi une transfection d'un siRNA anti luciférase.

Dans une première manipulation, deux lignées HA-CENP A S7A (HA-CENP A S7A1 et HA-CENP A S7A2) ont été testées. Dans les manipulations suivantes, seule HA-CENP A S7A1 a été conservée en raison de la meilleure pénétrance du phénotype PSCS dans cette lignée. Le phénotype PSCS est peu comparable à celui rencontré lors de la déplétion de la Shugoshin. Les chromatides PSCS restent à proximité les uns des autres, rendant l'interprétation parfois délicate.

Les cellules interphasiques déplétées pour le CENP A endogène présentent une morphologie comparable à des cellules HeLa non mutées pour CENP A. On peut toutefois remarquer la présence de cellules fortement polyploïdes. Ce phénomène est à relier à l'expression d'une quantité anormalement élevée de CENP-A (endogène + transgène) qui est à l'origine de défauts de ségrégation (Heun et al.)

D'une manière générale, il a été constaté un taux d'expression hétérogène de la protéine HA-CENP A dans ces lignées, ce qui a imposé un travail de sous clonage pour chacune de ces lignées après les premières séries de transfections siCENP A.

2. Sélection de nouveau clones

C'est essentiellement la lignée témoin, HA-CENP A WT qui présentait une variabilité de l'expression du transgène. C'est sur cette lignée que se sont concentrés les efforts de sous clonage. Lors de l'isolement de ces nouveaux clones, seuls deux clones ayant une expression de HA-CENP A WT ont pu être isolés (sur 480 puitsensemencés). Une vingtaine de clones HA-CENP A S7A ont parallèlement été isolés. Les clones sélectionnés sont ceux qui présentent le marquage HA et dont le marquage CREST montre deux bandes (une pour le CENP A endogène, l'autre pour la protéine recombinante HA-CENP A WT ou S7A). Afin d'exclure toute contamination par une lignée HA-CENP A S7A, un Western blot est réalisé avec l'anticorps anti CENP A S7ph (Figure 63).

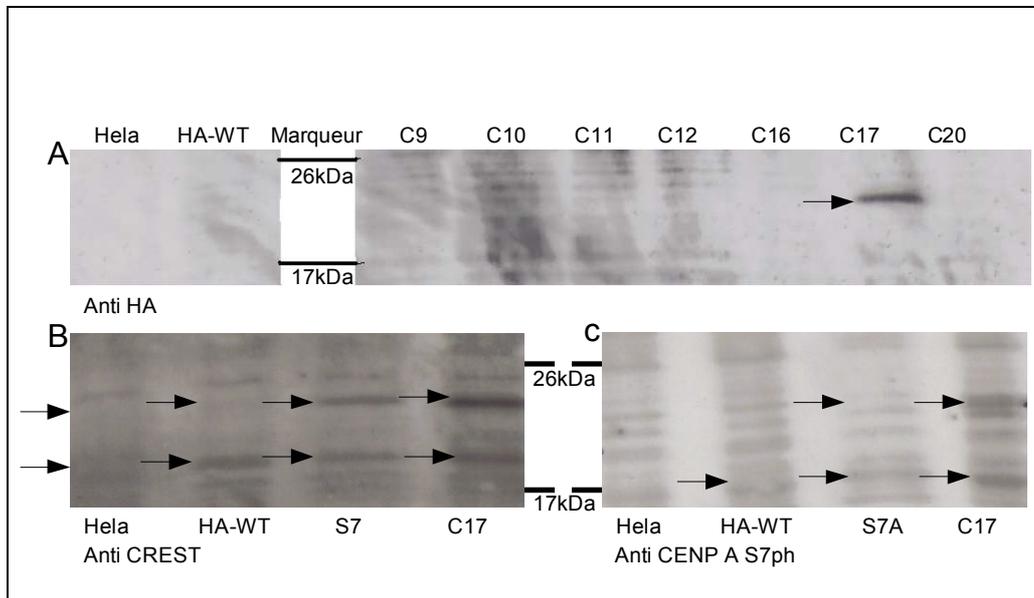


Figure 63 : Western blot présentant le mode de sélection du clone 17 (C17), lors du sous clonage de la lignée HA-CENP A WT ayant dérivé. Le contrôle négatif est fourni par un extrait de cellules HeLa non modifiées. En A, le Western blot anti HA ne montre une positivité que pour le clone 17. En B, l'expression du transgène est comparée à l'expression du CENP A endogène grâce au marquage CREST (qui marque le CENP A taggé et le CENP A endogène). En C, la phosphorylation du HA CENP A WT sur la sérine 7 est positive pour le CENPA taggé et endogène pour le clone 17, et négative pour l'extrait de la lignée HA CENP A S7A. Le contrôle de dépôt est fourni par les bandes non spécifiques.

3. Indice mitotique et PSCS

Les résultats des premières manipulations qui vont être exposés maintenant pourraient être remis en cause, celles-ci ayant été réalisées alors que les lignées dérivait et perdaient l'expression de la protéine taggée HA. Lors de la déplétion du CENP A endogène, l'indice mitotique est légèrement augmenté dans les lignées HA-CENP A S7A par rapport à la lignée HA-CENP A WT.

Le taux de PSCS est légèrement augmenté mais de manière reproductible, il est de 11,05% (+/- 0,15% n=18520) pour la lignée sérine substituée en alanine contre 1,7% (n=1762) pour la lignée contrôle négatif sans déplétion de l'endogène.

4. Données des immunomarquages lors de la déplétion du CENP A endogène sur les lignées.

a. Marquage H3S10ph

Les mitoses des cellules portant le transgène HA-CENP A S7A qui présentent le phénotype PSCS montrent le marquage H3S10ph de manière superposable au témoin HA-CENP A WT. La substitution sérine/alanine a donc bien pour conséquence une séparation des chromatides sœurs avant la satisfaction du checkpoint de la mitose (Figure 64).

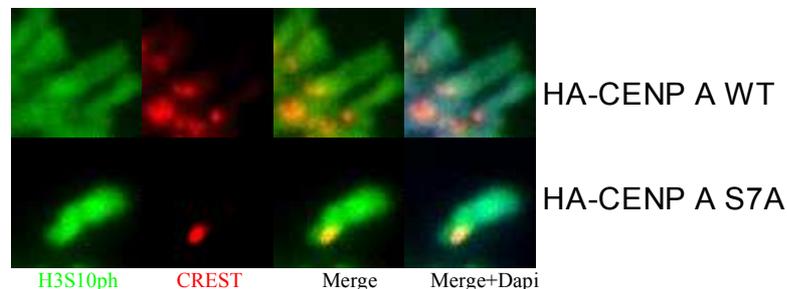


Figure 64 : **Marquage H3S10ph sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène** : Co-immunomarquage de la phosphorylation de H3S10 (en vert), des centromères par le CREST (en rouge), l'ADN est colorée par le Dapi. La ligne HA-CENP A WT présente, lors de la déplétion du CENP A endogène, la manipulation témoin, la ligne HA-CENP A S7A la manipulation sur la lignée d'intérêt. (x1200)

b. Marquage H3K4dm

La diméthylation H3K4 n'est pas perturbée par la substitution du CENP A endogène par le HA-CENP A (WT et S7A). Ce marquage persiste sur les chromatides présentant le phénotype PSCS des lignées HA-CENP A S7A (Figure 65).

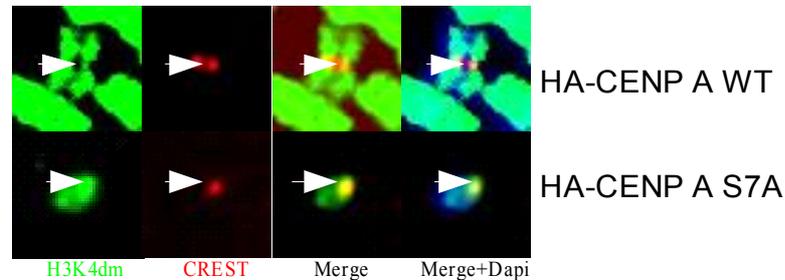


Figure 65 : **Marquage H3K4dm sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène** : La diméthylation d'H3K4 est présentée en vert, les centromères en rouge sur les deux lignées après la déplétion du CENP A endogène. (x1200)

c. Marquage BUB1

Conformément à nos attentes, la protéine BUB1 ne voit pas sa localisation altérée par la présence du tag HA sur le CENP A des lignées établies. Sa localisation reste centromérique, y compris sur les mitoses présentant le phénotype PSCS. La phosphorylation de CENP A S7 n'est donc pas nécessaire à la localisation centromérique de BUB1 (Figure 66).

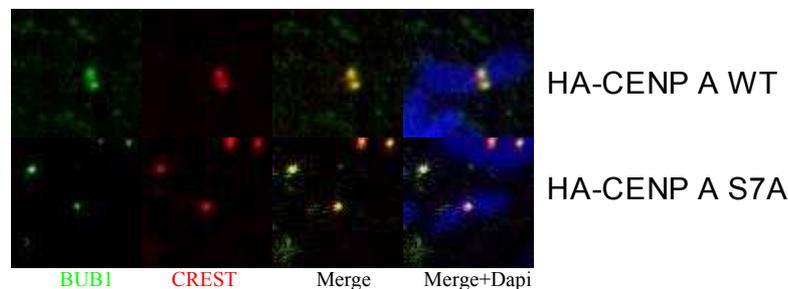


Figure 66 : **Marquage de BUB 1 sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène** : Immunomarquage de BUB 1 en vert, des centromères en rouge (marqués par le CREST, l'ADN est colorée par le Dapi. La ligne HA-CENP A WT présente, lors de la déplétion du CENP A endogène, la manipulation témoin, la ligne HA-CENP A S7A la manipulation sur la lignée d'intérêt. (x1200)

d. Marquage Shugoshin 1

La lignée HA-CENP A WT montre un marquage centromérique de la Shugoshin 1, parfaitement superposable à celui d'une cellule HeLa non modifiée. L'étiquette HA n'a, là encore, aucune influence sur la localisation de la protéine étudiée.

Les chromatides présentant le phénotype PSCS présentent elles aussi un marquage centromérique pour la Shugoshin 1. L'implication de la phosphorylation de CENP A S7ph dans la localisation de Shugoshin 1 est donc à exclure (Figure 67).

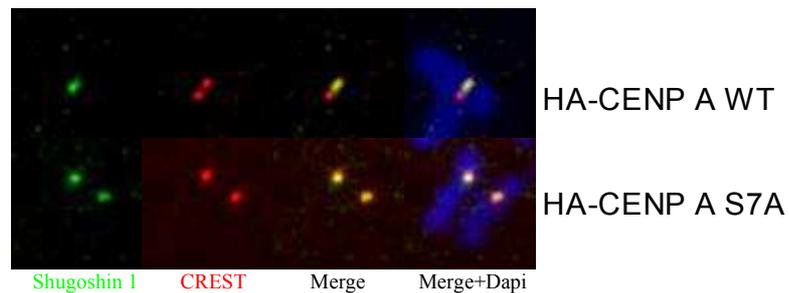


Figure 67 : **Marquage de la Shugoshin 1 sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène** : L'immunomarquage de la Shugoshin 1 est présenté en vert, les centromères sont localisés par le CREST. La ligne HA-CENP A WT présente, lors de la déplétion du CENP A endogène, la manipulation témoin, la ligne HA-CENP A S7A la manipulation sur la lignée d'intérêt. (x1200)

e. Marquage Aurora A

Aurora A réalise la primo phosphorylation de la sérine 7 de CENP A (Kunitoku *et al.*, 2003). La lignée HA-CENP A WT ne montre comme attendu aucune différence dans la localisation d'Aurora A. Au kinétochore des chromatides PSCS, en l'absence de la sérine phosphorylable sur la lignée HA CENP A S7A, Aurora A est aussi présente. Cet élément montre que la substitution S →A, mime efficacement le CENP A endogène. Cela confirme en outre qu'Aurora A n'est pas localisée au centromère par CENP A S7ph (Figure 68).

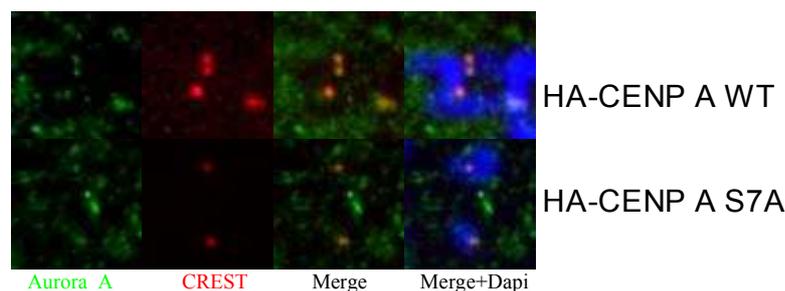


Figure 68 : **Marquage d'Aurora A sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène** : Co-immunomarquage d'Aurora A en vert, des centromères en rouge (marquage par le CREST), l'ADN est coloré par le Dapi. La ligne HA-CENP A WT présente, lors de la déplétion du CENP A endogène, la manipulation témoin, la ligne HA-CENP A S7A la manipulation sur la lignée d'intérêt. (x1200)

f. Marquage Aurora B

Le marquage Aurora B sur la lignée contrôle HA-CENP A WT est identique à celui retrouvé sur des cellules HeLa non modifiées. Le tag HA n'a donc pas d'influence sur la localisation d'Aurora B.

Aurora B assure la phosphorylation de la sérine 7 en relais d'Aurora A (Kunitoku *et al.*, 2003). Cette primo phosphorylation sur la lignée HA-CENP A S7A étant impossible, on constate qu'Aurora B perd sa localisation centromérique (Figure 69).

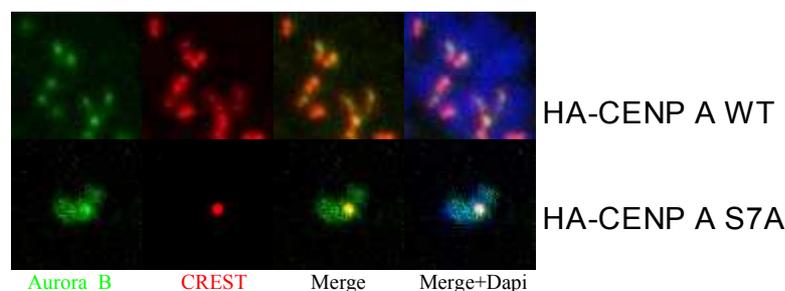


Figure 69 : **Marquage d'Aurora B sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène** : Co-immunomarquage d'Aurora B en vert, des centromères en rouge (marquage par le CREST), l'ADN est coloré par le Dapi. La ligne HA-CENP A WT présente, lors de la déplétion du CENP A endogène, la manipulation témoin, la ligne HA-CENP A S7A la manipulation sur la lignée d'intérêt. (x1200)

g. Marquage H3T3ph

Une fois encore, l'examen de la lignée HA CENP A WT permet de mettre en évidence que l'étiquette HA ne modifie pas la localisation de l'activité de l'Haspin. Par contre le marquage H3T3ph est diffus sur les chromatide PSCS sur la lignée substituée S7A (Figure 70).

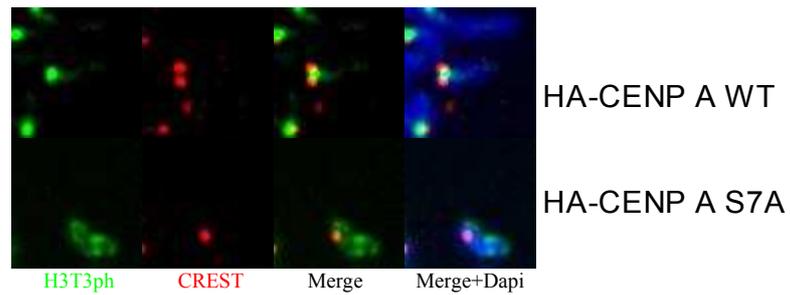


Figure 70 : **Marquage d'H3T3ph sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène** : Co-immunomarquage de la phosphorylation de H3T3 (en vert), des centromères en rouge (marquage par le CREST), l'ADN est coloré par le Dapi. La ligne HA-CENP A WT présente, lors de la déplétion du CENP A endogène, la manipulation témoin, la ligne HA-CENP A S7A la manipulation sur la lignée d'intérêt. (x1200)

VI. Déplétion Aurora B

1. Aspect général

Lors de la déplétion d'Aurora B, on peut attendre une altération grave de l'activité du *chromosomal passenger complex*. Sur les échantillons analysés, on peut en effet constater une absence de séparation des bras des chromosomes sur les mitoses des cellules transfectées avec le siARN anti Aurora B (siAu B). L'absence de séparation des bras des chromosomes a pour effet d'empêcher la survenue du phénotype PSCS.

Les cellules interphasiques KO pour Aurora B présentent un phénotype très nettement différent des cellules témoins. En effet, elles sont multinucléées (Figure 71), ce qui peut être expliqué par le rôle important que tient Aurora B dans la cytotéière. Ce phénomène augmente artificiellement l'indice mitotique (les cellules filles ne pouvant se séparer fusionnent, le nombre de cellules n'est donc pas doublé à chaque mitose).

Une autre différence morphologique constatée sur ces manipulations est la présence de multiples centrosomes dans les cellules en mitose. Cela conduit à des figures mitotiques multipolaires (Figure 71).

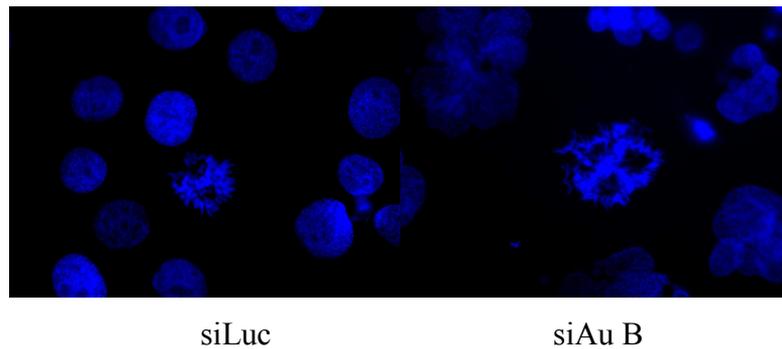


Figure 71 : Aspect des mitose sur une lame témoin (siLuc) et dans le cadre de la déplétion d'Aurora B (siAu B). (x400 coloration par le Dapi)

2. Indice mitotique et PSCS

L'indice mitotique des cellules déplétées en Aurora B est de 6,15% ($\pm 0,25$, $n=829$) contre 2,25% ($\pm 0,25$, $n=3690$). Le taux de PSCS est très faible sur cette déplétion. Ceci était attendu en raison du rôle connu d'Aurora B dans le « prophase pathway ». Il est de 0,15% ($\pm 0,15$, $n=517$) contre 2,85% ($\pm 0,25$, $n=652$). Ces résultats sont comparables aux données de la littérature.

3. Données des immunomarquages

a. Marquage H3S10ph

Aurora B est la protéine majoritairement responsable de la phosphorylation de H3S10. En conséquence, le marquage H3S10ph est très nettement diminué sur les cellules déplétées pour Aurora B (Figure 72). Curieusement, H3S10ph reste plus nettement marqué au centromère.

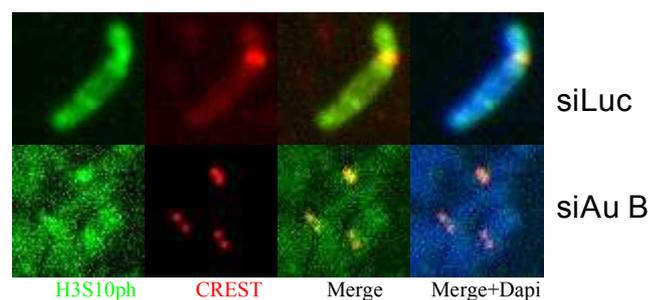


Figure 72: **Marquage d'H3S10ph lors de la déplétion d'Aurora B** : Le marquage H3S10ph est présenté en vert, les centromère sont localisés par le CREST (en rouge) l'ADN est coloré au Dapi. La ligne siLuc présente la déplétion témoin, la ligne siAu B la déplétion d'Aurora B. (x1200)

b. Marquage H3K4dm

Malgré les difficultés d'observation, le marquage de la diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 est toujours observable lors du KO d'Aurora B. Cette observation avait été effectuée au préalable par l'équipe (Eot-Houllier *et al.*, 2008) (Figure 73)

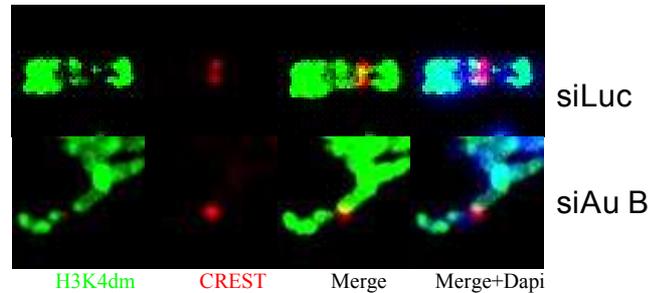


Figure 73: **Marquage d'H3K4dm lors de la déplétion d'Aurora B** : L'immunomarquage de la diméthylation d'H3K4 est présenté en vert, les centromères sont identifiés par le CREST (en rouge), l'ADN étant coloré par le Dapi. La ligne siLuc présentant la déplétion témoin, la ligne siAu B la déplétion d'Aurora B. (x1200)

c. Marquage BUB1

BUB 1 est retrouvée au centromère au cours de la mitose sur des cellules déplétées Aurora B. L'intensité du signal est équivalente à celle des cellules témoins (Figure 74).

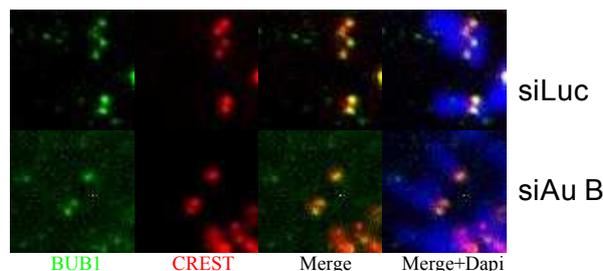


Figure 74: **Marquage de BUB1 lors de la déplétion d'Aurora B** : Immunomarquage de la protéine BUB1 (en vert), du centromère en rouge (par le CREST) sur une manipulation témoin (ligne siLuc) et sur une manipulation de déplétion d'Aurora B (ligne siAu B). (x1200)

d. Marquage Shugoshin 1

La Shugoshin est délocalisée au cours de la déplétion d'Aurora B, on observe une fuite de la Shugoshin du centromère entre les bras du chromosome (Figure 75). Ce phénomène n'était pas attendu et suggère qu'Aurora B a un rôle direct ou indirect dans la localisation de SGO1.

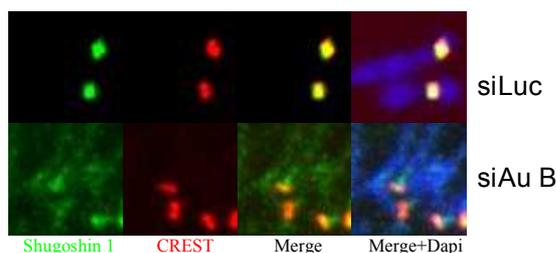


Figure 75: **Marquage de la shugoshin 1 lors de la déplétion d'Aurora B** : La Shugoshin 1 est immunomarquée en vert, les centromères sont marqués en rouge par le CREST, l'ADN étant contre coloré par le Dapi. La ligne siLuc présente le témoin négatif, la ligne siAu B présente la déplétion d'Aurora B. (x1200)

e. Marquage Aurora A

Le marquage Aurora A subsiste au centromère des cellules déplétées (Figure 76), L'intensité de la fluorescence qui a été mesurée n'a pas montré de différence dans le rapport signal Aurora A / signal CREST (non présenté).

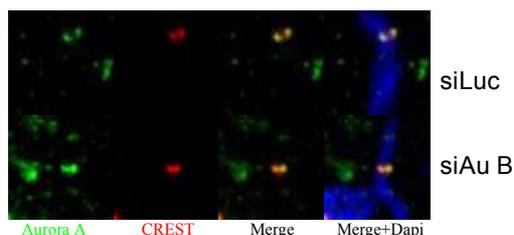
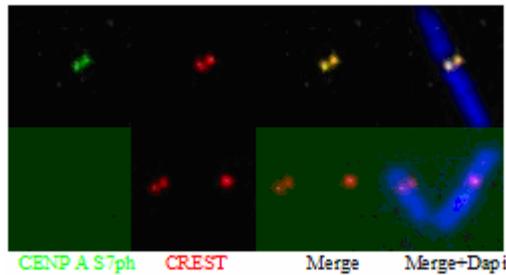


Figure 76: **Marquage d'Aurora A lors de la déplétion d'Aurora B** : le marquage Aurora A est présenté en vert, les centromères en rouge (marquage par le CREST), l'ADN est mis en évidence par le Dapi. Les chromatides des cellules témoins sont présentées sur la ligne siLuc, celles des cellules déplétées en Aurora B sur la ligne siAu B. (x1200)

f. Marquage CENP A S7ph

La littérature décrit qu'Aurora A amorce la phosphorylation de CENP A S7, puis qu'Aurora B entretient cette phosphorylation. En l'absence d'Aurora B, le signal CENP A S7ph est très nettement diminué, il est pratiquement invisible, mais subsiste lors de quantification (Figure 77).

A



B

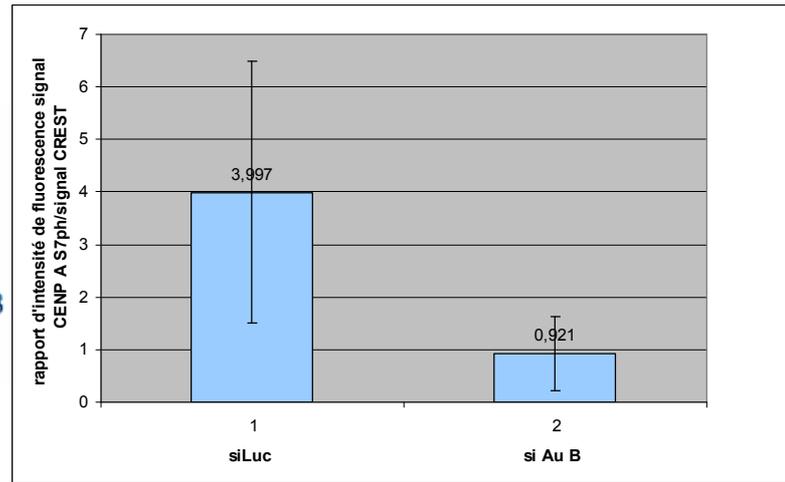


Figure 77: **Marquage de CENP A S7ph lors de la déplétion d'Aurora B et quantification de sa fluorescence** : A : L'immunomarquage de la phosphorylation de CENP A S7 est présenté en vert, les centromères sont localisés par le CREST (en rouge), l'ADN est mis en évidence par le Dapi. La ligne siLuc présente le témoin, la ligne siAu B la déplétion d'Aurora B. (x1200) ; B : Quantification des rapports d'intensité de fluorescence entre les signaux CREST et CENP A S7ph dans la manipulation témoin (siLuc) est lors de la déplétion d'Aurora B (siAu B).

g. Marquage Aurora B

Le marquage Aurora B est fortement diminué sur ces déplétions, comme pouvait le laisser présager le Western-Blot (Figure 78).

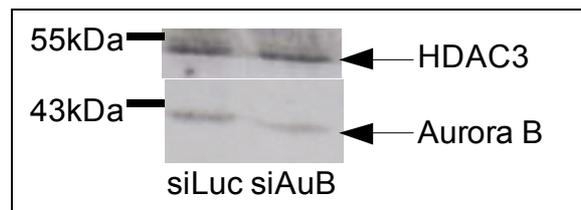


Figure 78 : Mise en évidence par Western-Blot de la protéine Aurora B dans le cadre de la déplétion témoin (siLuc) et lors de la déplétion d'Aurora B (siAu B). La mise en évidence d'HDAC 3 est utilisée en qualité de témoin de dépôt.

h. Marquage H3T3ph

Jonathan Higgins avait communiqué à Christian Jaulin que l'Haspin était phosphorylée par elle-même et Aurora B. La déplétion d'Aurora B n'annihile pas l'activité de l'Haspin, mais conduit à sa délocalisation. Comme dans les déplétions précédentes, le signal H3T3ph est réparti le long des bras des chromosomes. Il semble parfois localisé entre les deux chromatides non séparées (Figure 79).

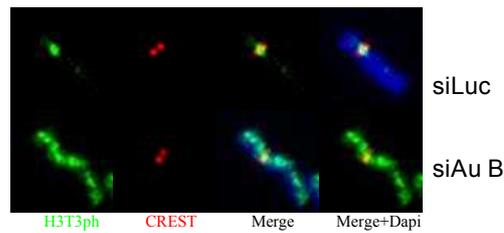


Figure 79: **Marquage H3T3ph lors de la déplétion d'Aurora B** : La localisation de l'activité de l'Haspin est mise en évidence par le marquage de la phosphorylation d'H3T3 (en vert), les centromères sont marqués en rouge par le CREST, l'ADN est coloré par le Dapi. La ligne siLuc présente la déplétion témoin, la ligne siAu B la manipulation de déplétion d'Aurora B. (x1200)

VII Déplétion de l'Haspin

1. Aspect général

Depuis les travaux d'Higgins, le phénotype lié à la déplétion de l'Haspin est bien connu. Les cellules interphasiques ne montrent pas d'anomalies majeures, seules les cellules mitotiques présentent un phénotype de PSCS assez pénétrant. Les chromatides PSCS dans cette déplétion se présentent, comme dans le cas des KO HDAC3 et Shugoshin 1, fortement condensées et nettement séparées les unes des autres (figure 80).

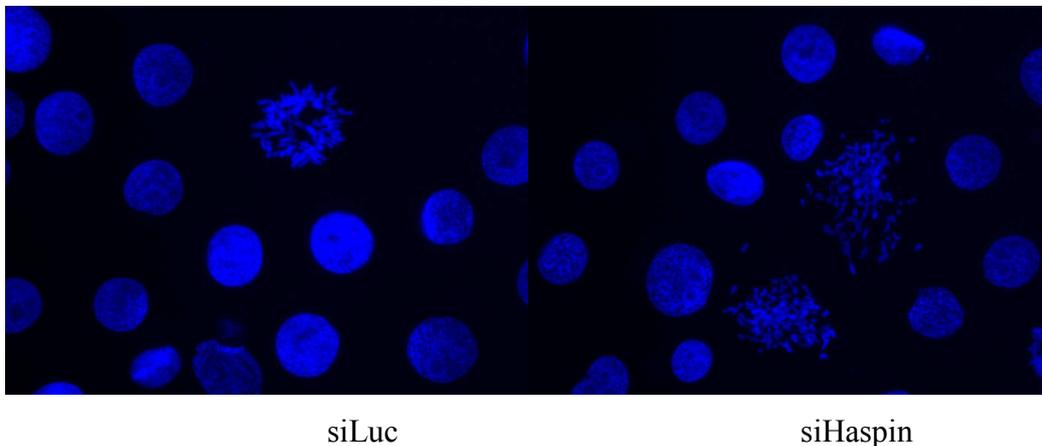


Figure 80 : Aspect des mitoses lors de la déplétion témoin (siLuc) et lors de la déplétion de l'Haspin, l'ADN est coloré par le Dapi. (x400)

2. Indice mitotique et PSCS

La déplétion de l'Haspin conduit à une augmentation de l'indice mitotique. Les cellules déplétées montrent un indice mitotique de 6,5% (+/-0,5%, n=1301) contre 3,05% (+/-0,15%, n=727) pour le témoin.

Le taux de PSCS reste moins spectaculaire que lors de la déplétion de la Shugoshin, mais il est conséquent, avec une pénétrance de 47,5% (+/-2,5%, n=1374) des mitoses comptabilisées contre 1,75% (+/-0,75%, n=664) pour le témoin négatif.

3. Données des immunomarquages

a. Marquage H3S10ph

Le marquage H3S10ph dans les figures mitotiques présentant le phénotype PSCS est équivalent à celui du témoin (Figure 81).

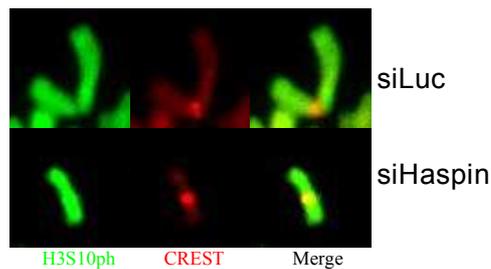


Figure 81: **Marquage H3S10ph lors de la déplétion de l'Haspin** : la phosphorylation de H3S10 est marquée en vert, les centromères sont localisé par un marquage CREST (en rouge). La ligne siLuc présente le témoin négatif, la ligne siHaspin la manipulation de déplétion de l'Haspin. (x1200)

b. Marquage H3K4dm

La diméthylation de H3K4 persiste aux centromères des chromatides PSCS au cours de la déplétion Haspine. Les données de l'imagerie sont confirmées par la quantification de la fluorescence au centromère pour le signal H3K4dm (Figure 82).

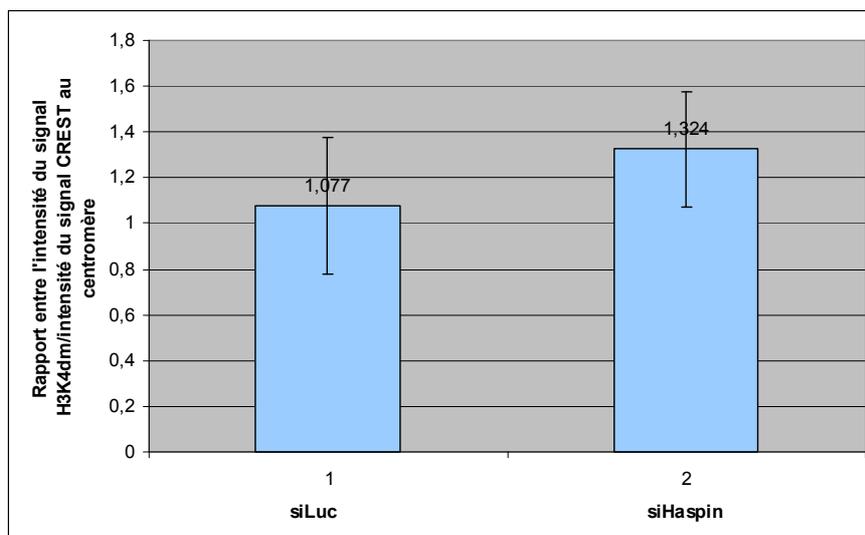


Figure 82 : Quantification de la fluorescence du marquage H3K4dm au centromère.

c. Marquage BUB1

BUB1 est attendu non délocalisé au cours du KO Haspin. Les données de l'immunofluorescence permettent de confirmer cette hypothèse. BUB1 reste présente au kinétochores des chromatides PSCS de manière aussi intense que sur le témoin. (Figure 83).

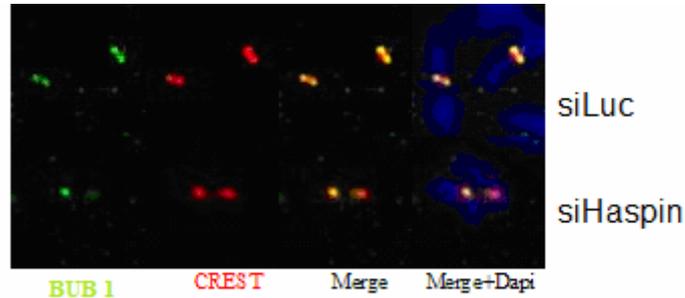


Figure 83 : **Marquage de BUB1 lors de la déplétion de l'Haspin** : Co-immunomarquage de BUB1(en vert), du centromère en rouge par le CREST, l'ADN est colorée par le Dapi. La ligne siLuc présente la manipulation témoin, la ligne siHaspin la manipulation de déplétion de l'Haspin. (x1200)

d. Marquage Shugoshin 1

Conformément aux attentes, le marquage de la shugoshin 1 reste présent aux centromères des chromatides sœurs séparées (Figure84).

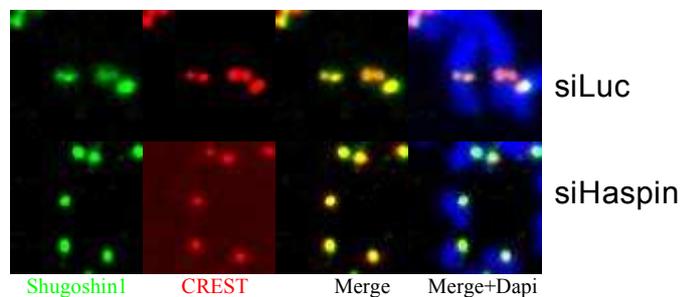
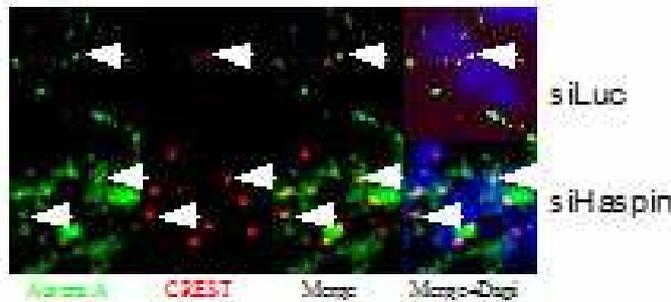


Figure 84: **Marquage Shugoshin 1 lors de la déplétion de l'haspin** : Données des immunomarquage de la Shugoshin 1 (en vert), du centromère en (rouge par le CREST), l'ADN étant coloré par le Dapi. La ligne siLuc présente la manipulation témoin, la ligne siHaspin la manipulation de déplétion de l'Haspin.

e. Marquage Aurora A

Aurora A semble toujours localisée au centromère lors de la déplétion de l'Haspin. Toutefois, le fuseau mitotique des cellules présentant le phénotype PSCS étant effondré, le signal Aurora A est pollué par un important bruit de fond. Les données de quantification, même en utilisant des masques couvrant uniquement le kinétochore (spécifié par le signal CREST), ne permettent pas d'exclure la présence d'Aurora A au centromère (Figure 85).

A



B

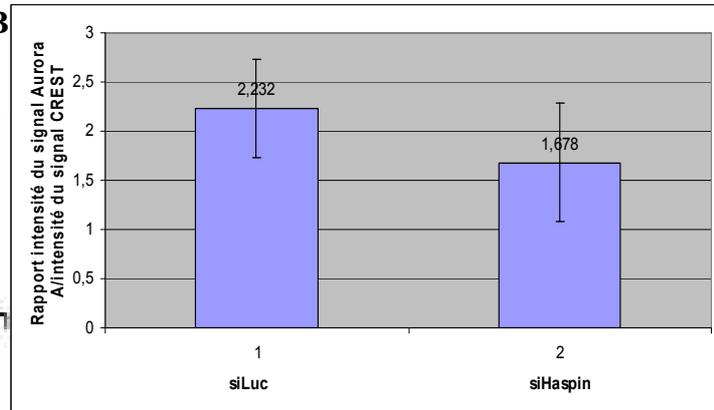
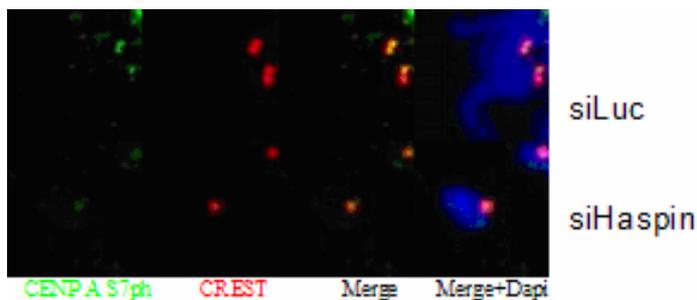


Figure 85: **Marquage Aurora A et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de l'Haspin** : A : Données du co-marquage d'Aurora A (en vert) du CREST (en rouge qui localise le centromère), les flèches pointent les centromères sur le témoin négatif (ligne siLuc) et sur la déplétion de l'Haspin (ligne siHaspin). B Quantification du rapports d'intensité de fluorescence entre le signal Aurora A et CREST.

f. Marquage CENP A S7ph

La présence supposée d'Aurora A aux centromères des chromatides PSCS, laisse supposer la persistance du marquage CENPA S7ph. Cette persistance de la phosphorylation de la sérine 7 de CENP A est en effet observable. La quantification de la fluorescence montre toutefois une diminution de l'intensité du signal de 40% (Figure 86).

A



B

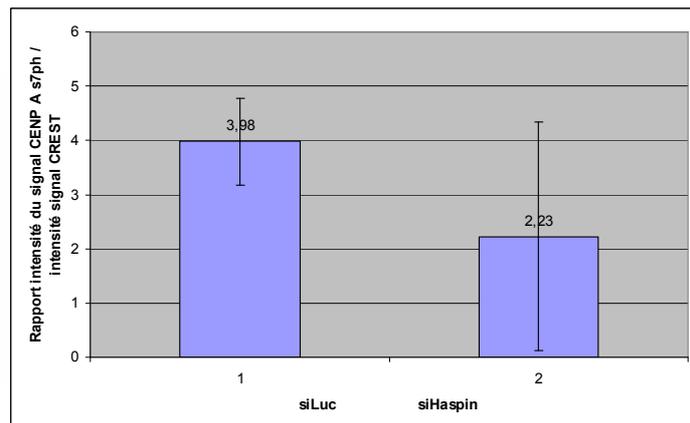


Figure 86: **Marquage de CENP A S7ph et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de l'Haspin** : A : Immunomarquage de CENP A S7ph en vert, localisation des centromère en rouge par le CREST, contre coloration de l'ADN par le Dapi en bleu. La ligne du haut présente le témoin négatif, celle du bas la déplétion de l'Haspin. B : Quantification du rapport entre l'intensité de la fluorescence de ces marquages.

g. Marquage Aurora B

Aurora B est délocalisée lors de la déplétion de l'Haspine. Comme dans le cas des déplétions qui conduisent à un phénotype PSCS, elle est diffuse sur les chromatides (Figure 87).

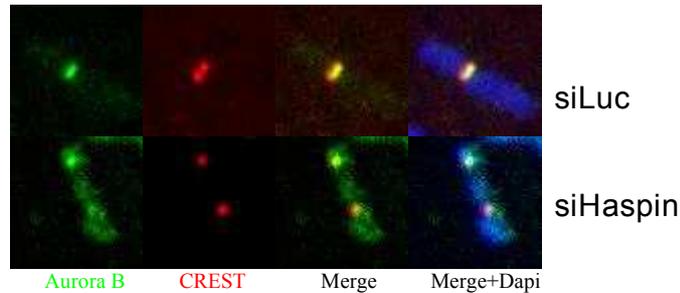


Figure 87: **Marquage Aurora B lors de la déplétion de l'Haspin** : Immunomarquage d'Aurora B en vert, CREST en rouge, l'ADN est colorée par le Dapi. La ligne du haut présente le témoin, la ligne du bas la déplétion de l'Haspin.

h. Marquage H3T3ph

Comme présenté sur le Western blot, la phosphorylation de la thréonine 3 de l'histone H3 est absente des cellules déplétées en Haspin (Figure 88).

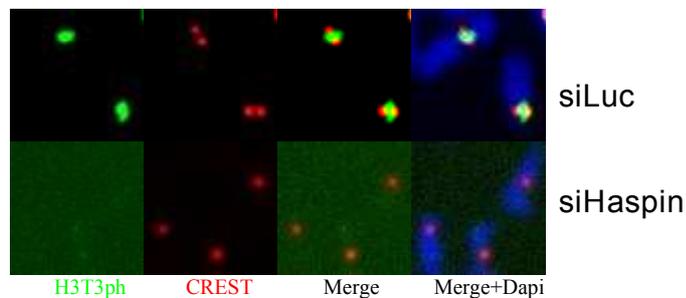


Figure 88 : **Marquage H3T3ph lors de la déplétion de l'Haspin** : Co-marquage H3T3ph (en vert) et CREST (en rouge pour localiser les centromère). La contre coloration es chromatides est réalisée par le Dapi. La ligne siLuc présente le témoin négatif, la ligne u bas la déplétion d'intérêt.

VIII. Résumé des résultats.

Pour pouvoir être discutés, l'ensemble de ces résultats est à mettre en relief avec les résultats attendus et les difficultés techniques rencontrées. Les tableaux suivants vise à remplir cette fonction.

Dans l'ensemble, toutes ces manipulations conduisent à un phénotype PSCS plus ou moins pénétrant, mais reproductible, aux exceptions attendues des déplétions BUB1 et Aurora B

1. Déplétion HDAC3

La déplétion HDAC 3 présente des résultats similaires à ceux attendus dans le modèle testé.

Les résultats sont résumés dans le tableau 5. Seule subsiste une incertitude relative sur la phosphorylation de la sérine 7 de CENP A.

Δ HDAC 3	H3S10ph	H3K4dm	BUB1	Shugoshin 1	Aurora A	CENP A S7ph	Aurora B	Haspin
Attendu	Intense	Nul	Nul / délocalisé	Nul / Délocalisé	Nul / Délocalisé	Nul	Nul / Délocalisé	Nul / délocalisé
Observé	Intense	Nul	Diminué	Nul	Diminué	Ambiguë / Diminué	Délocalisé	Délocalisé

Tableau 5: Résumé des données de l'immunofluorescence pour la déplétion HDAC3. Le seul point pour lequel les résultats obtenus durant le stage ne sont pas définitivement établis est la phosphorylation de CENP A S7ph.

2. Déplétion BUB1

La déplétion de BUB1 présente des résultats en conformité avec le modèle testé pour la majorité des points. Le point CENP A S7ph n'a pas pu être évalué en raison de problèmes de conservation de l'anticorps (Tableau 6).

Δ BUB1	H3S10ph	H3K4dm	BUB1	Shugoshin 1	Aurora A	CENP A S7ph	Aurora B	Haspin
Attendu	Intense	Présent	Nul	Nul / Délocalisé	Nul / Délocalisé	Nul	Nul / Délocalisé	Nul / délocalisé
Observé	Intense	Présent	Nul	Nul	Diminué fortement		Délocalisé	Délocalisé

Tableau 6: La déplétion de BUB1 donne des résultats conforme à ceux attendus. Le marquage CENPA S7ph n'a pas donné de résultats satisfaisants et ne peut être intégré dans les résultats de cette étude.

3. Déplétion Shugoshin 1

La déplétion de la Shugoshin 1 a permis de remettre en cause le modèle testé. En effet, Aurora A qui était attendu absente des kinétochores des chromatides PSCS s'est révélée être présente (Tableau 7).

Δ SGO 1	H3S10ph	H3K4dm	BUB1	Shugoshin 1	Aurora A	CENP A S7ph	Aurora B	Haspin
Attendu	Intense	Au centromère	Au centromère	Nul	Nul / Délocalisé	Nul	Nul / Délocalisé	Nul / délocalisé
Observé	Intense	Au centromère	Au centromère	Nul	Présent au centromère	Diminué	Délocalisé	Délocalisé

Tableau 7: La déplétion de la Shugoshin 1 montre une indépendance d'Aurora A vis-à-vis de la Shugoshin 1 pour sa localisation au centromère.

4. Déplétion Aurora A

Les résultats fournis par cette déplétion sont conformes aux prévisions (Tableau 8).

Δ Au A	H3S10ph	H3K4dm	BUB1	Shugoshin 1	Aurora A	CENP A S7ph	Aurora B	Haspin
Attendu	Intense	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Nul	Nul	Nul / Délocalisé	Nul / délocalisé
Observé	Intense	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Nul	Diminué de 80%	Délocalisé	Délocalisé

Tableau 8: Les résultats fournis par ces manipulations sont superposables aux prévisions

5. Déplétion CENP A sur les lignées HA-CENP A WT/S7A

La dérive de la lignée HA CENP A WT, qui perdait l'expression du transgène, ne permet pas de fournir des résultats factuels. Les manipulations effectuées permettent toutefois de fournir des résultats informels conformes aux prévisions (Tableau 9). Ils permettent par ailleurs de prouver l'innocuité de l'étiquette HA sur le comportement de protéines HA-CENP A WT et S7A.

Δ CENP A	H3S10ph	H3K4dm	BUB1	Shugoshin 1	Aurora A	Aurora B	Haspin
Attendu	Intense	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Nul / Délocalisé	Nul / délocalisé
Observé	Intense	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Délocalisé	Délocalisé

Tableau 9: Résumé des résultats obtenus lors de la déplétion du CENP A endogène sur la lignée HA CENP A S7A. Ces résultats montrent que la non phosphorylation de la sérine 7 de CENP A n'a d'influence que sur la localisation d'Aurora B et de l'Haspin.

6. Déplétion Aurora B

Les résultats obtenus dans le cadre de la déplétion d'Aurora B montrent que cette protéine a une influence non seulement sur la localisation de l'Haspin, mais, ce qui était moins attendu, sur la localisation de la Shugoshin 1 (Tableau 10).

Δ Au B	H3S10ph	H3K4dm	BUB1	Shugoshin 1	Aurora A	CENP A S7ph	Aurora B	Haspin
Attendu	Diminué	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Diminué	Nul	Nul / délocalisé
Observé	Diminué	Au centromère	Au centromère	Délocalisée sur les bras	Au centromère	Diminué de 60%	Nul	Délocalisé

Tableau 10: La déplétion d'Aurora B conduit à une délocalisation inattendue de la Shugoshin 1 sur les bras des chromosomes.

7. Déplétion Haspin

Les résultats obtenus au cours de ces manipulations sont similaires à ceux qui étaient attendus. Il subsiste encore une incertitude sur la réelle localisation d'Aurora A au kinétochore, en raison du fort bruit de fond lié à l'effondrement du fuseau mitotique sur les mitoses PSCS (Tableau 11).

Δ Haspin	H3S10ph	H3K4dm	BUB1	Shugoshin 1	Aurora A	CENP A S7ph	Aurora B	Haspin
Attendu	Intense	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Au centromère	positif	Nul / Délocalisé	Nul / délocalisé
Observé	Intense	Au centromère	Au centromère	Au centromère	Ambiguë / au centromère	positif	Délocalisé	Délocalisé

Tableau 11 : Synthèse des résultats obtenus dans le cadre de la déplétion de l'Haspin. Le seul résultat non factuel est la présence d'Aurora A au centromère des chromatides PSCS, qui est délicate à dégager du bruit de fond.

Discussion

I. Difficultés techniques

Au cours de ce stage, nous avons été confrontés à des difficultés d'ordre technique dont certaines particulièrement "chronophages". Certaines relevaient d'impondérables comme la dérive des lignées, d'autres étaient liées à des difficultés de mise au point.

1. Dérive de la lignée témoin et extinction du CENP A endogène

a. Dérive de la lignée HA-CENP A WT

Les lignées HA-CENP A WT et HA-CENP A S7A, ont été établies par Géraldine Fulcrand au cours de sa thèse effectuée au sein de l'équipe. Ces lignées présentent une résistance à la Généticine censée préserver l'expression du transgène. Malgré leur entretien dans un milieu enrichi en cet antibiotique, la lignée HA-CENP A WT (dont la fonction est de s'assurer de l'absence d'artefact du à l'étiquette HA) a brutalement perdu l'expression de la protéine taggée, tout en conservant la résistance à la généticine. Les aliquotes congelés ont présenté la même propension à dériver après quelques passages. La persistance de l'expression du transgène HA CENP A S7A exclue une détérioration du lot de généticine employé. La sélection de nouveaux clones semble avoir résolu cette difficulté.

La dérive de cette lignée témoin a mis en évidence la difficulté d'éteindre la protéine CENP A dans la cellule.

b. Extinction du CENP A endogène

La déplétion du CENP A endogène sur la lignée HA-CENP A WT ayant perdu l'expression du transgène, conduisait à une perte de la fonction centromérique. En effet, chez les mammifères, c'est cette protéine qui spécifie la localisation du centromère (Black *et al.*, 2007). Les cellules déplétées présentaient de fait des phénotypes aberrant, y compris des phénotypes PSCS. Ces phénotypes restaient peu pénétrants, en raison de la demi-vie du CENP A endogène relativement longue (5jours).

Sur les manipulations réalisées sur la lignée mutée HA-CENP A S7A la pénétrance du phénotype PSCS est à peine supérieure à celle de la lignée témoin ayant dérivé. Les tests effectués par Géraldine Fulcrand en RtPCRQ (*Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction quantitative*) lors de l'établissement des lignée montaient une extinction de l'ARNm de CENP A. Dans les conditions de transfection utilisées, il subsistait donc probablement un fond de CENP A indétectable en immunofluorescence et en Western Blot, mais suffisant pour maintenir la cohésion au centromère. Pour valider cette hypothèse, de nouvelles procédures de transfection du siCENP A étaient en cours de développement en fin de stage. Les

modifications apportées concernaient trois paramètres : le temps d'incubation du siRNA, le nombre de transfections, et enfin la concentration en siRNA. Différentes conditions étaient en cours de test. Les résultats des premiers tests étaient encourageants avec des taux de PSCS atteignant les 20%.

2. Marquage Aurora A

La protéine Aurora A est relativement abondante dans la cellule en mitose. Sa localisation au centrosome et sur les microtubules avait jusqu'à présent masqué sa présence au centromère. L'utilisation de la technique de cyto centrifugation après un choc hypotonique, maîtrisée par l'équipe, a permis de mettre en évidence cette nouvelle localisation. Les premiers immunomarquages ont été réalisés avec un anticorps fait « à façon » par l'équipe "Cycle cellulaire" de l'UMR 6061. Ils laissaient apparaître un important bruit de fond. L'utilisation d'un anticorps commercial a limité ce désagrément sans pour autant le solutionner.

Sur les cellules présentant le phénotype PSCS, l'équipe a couramment constaté un effondrement du fuseau mitotique. La protéine Aurora A qui est associée au microtubule est alors présente de manière diffuse. Il devient alors délicat de dégager un signal au kinétochore d'une localisation artéfactuelle de la protéine. Il convient alors de supprimer autant que faire se peut le signal non spécifique d'une structure biologique. Comme Aurora A est soluble, plusieurs protocoles afin de diminuer le bruit de fond ont été tentés.

Nous avons, dans un premier temps, tenté de laver les cellules après la cyto centrifugation, mais avant la fixation, avec différents détergents utilisés à concentration croissante. Ces techniques de lavage couramment employées dans l'étude des cohésines se sont révélées inefficaces sur les cellules ayant subi un choc hypotonique. Les résultats obtenus montraient le plus souvent une disparition totale du signal Aurora A, ou bien encore des altérations morphologiques incompatibles avec une étude microscopique.

Une deuxième série de tests, effectuée en fixant les cellules avec une solution de paraformaldéhyde et détergent, a permis de diminuer le bruit de fond. Là encore, le signal était trop faible pour pouvoir être interpréter convenablement.

En dernier recours, l'emploi d'autres fixateurs, comme le glutaraldéhyde ou le méthanol, a été envisagé. Dans ce cas, le bruit de fond était fortement diminué, mais les chromosomes présentaient d'importantes modifications morphologiques.

A la fin du stage, malgré une longue période de tentative de mise au point, aucun protocole ne s'était révélé supérieur aux autres. Une analyse *a posteriori* des clichés pris laisse entrevoir que les cellules présentant le moins de bruit de fond sont celles présentes sur les lames les

moins riches en matériel cellulaire. Il serait intéressant de tester de nouvelles conditions expérimentales en augmentant la concentration de détergent lors de la perméabilisation des membranes ou en diminuant le nombre de cellules déposées.

3. Marquage CENP A S7ph

Le marquage CENP A S7ph a posé de nombreuses difficultés. En effet, les anticorps commerciaux proviennent tous du même lot. Il s'avère que, même en soignant particulièrement sa conservation, cet anticorps est peu stable dans le temps. Il perd toute spécificité après quelques utilisations. Les marquages génèrent progressivement du bruit de fond et ne permettent plus une quantification du signal au centromère. Les résultats présentés dans ce mémoire restent donc sujets à caution.

Le but de cette étude est de mettre en évidence le rôle la phosphorylation de la sérine 7 de CENP A dans le maintien de la cohésion. Il pourrait alors être envisageable de développer de nouvelles lignées exprimant un CENP A modifié portant en lieu et place de la sérine 7 un phosphomimétique. En mimant cette phosphorylation, la restauration d'un phénotype normal dans les diverses déplétions pourrait alors permettre de mieux cerner le rôle de CENP A S7ph. Cela permettrait de s'affranchir de la quantification de la fluorescence du marquage CENP A S7ph.

II. Validité du modèle proposé

L'ensemble des manipulations effectuées au cours de ce stage a d'affiner le modèle de la voie de transduction du signal de la cohésion au centromère des chromosomes métaphasique. La persistance du marquage H3S10ph dans tous phénotypes de chromatides sœurs séparés montre que celles-ci se séparent avant la satisfaction du checkpoint de la mitose. Les protéines étudiées ont bien une fonction dans le maintien de la cohésion au centromère dans les premières phases de la mitose.

1. La diméthylation de la lysine 4 de H3 est un élément précoce

La déplétion d'HDAC 3 conduit à la perte de la localisation centromérique de l'ensemble des protéines testées. La persistance de la diméthylation de H3K4 dans toutes les autres déplétions montre qu'elle intervient en amont de la voie de signalisation établie dans ce modèle.

2. BUB 1 est une protéine centrale de la gestion de la cohésion sur l'ensemble du chromosome

La déplétion de BUB1 ne conduit pas à un phénotype de PSCS. On constate toutefois, sur une petite série, un relâchement de la cohésion aux centromères dans environ 20% des mitoses. Il semble donc que l'activité de BUB1 a bien un rôle dans le maintien de la cohésion au centromère.

Par ailleurs, le maintien de la cohésion le long des bras du chromosome semble résulter de l'implication de BUB1 dans la voie de la prophase. Aurora B, responsable de la phosphorylation des cohésines en prophase, perd sa localisation centromérique lors de la déplétion de BUB1. Cette délocalisation est couramment observée dans les autres déplétions réalisées mais qui conduisent à un phénotype PSCS. Or la seule localisation connue de BUB1 est le kinétochore et son seul substrat est l'histone H2A.

Au cours des manipulations relatives, le KO BUB1 n'a pas permis de mettre en évidence la délocalisation sur les bras du chromosome des autres protéines testées (hormis celle de l'Haspin). Il est donc actuellement impossible de clarifier le lien entre BUB1 et l'activité d'Aurora B sur les cohésines en prophase.

3. La Shugoshin 1 et Aurora A sont indépendantes

La déplétion de la Shugoshin a permis de montrer qu'elle intervenait en aval de HDAC3 et de BUB1. SGO 1 permet aussi la bonne localisation au centromère d'Aurora B et de l'Haspin. Il était attendu que la Shugoshin 1 permettent la localisation au kinétochore d'Aurora A. Les immunomarquages et les quantifications de fluorescence ont permis de montrer sans ambiguïté qu'Aurora A restait localisée au kinétochore lors de la déplétion SGO 1. La déplétion Aurora A n'a quand à elle pas modifié la localisation centromérique de SGO 1. Aurora A et la Shugoshin interviennent donc de manière indépendante. Il existe donc deux voies pour spécifier le signal de la cohésion au centromère. L'une dépendante de la Shugoshin qui conduit à un phénotype très pénétrant avec 90% présentant le phénotype PSCS, l'autre dépendante de la primo phosphorylation de CENP A S7 par Aurora A. Ces deux voies sont sous le contrôle de BUB1.

4. Comment expliquer la perte de cohésion dans la déplétion d'Aurora A ?

a. La délocalisation de l'Haspin ?

En première intention, on peut estimer que c'est la délocalisation de l'Haspin qui conduit au phénotype PSCS observé lors du KO Aurora A. En effet, le rôle de l'Haspin est clairement établi dans cette fonction biologique. Sa déplétion, comme il a été montré dans les résultats exposés, conduit à un phénotype PSCS très pénétrant. Or les déplétions HDAC3, SGO 1 et Haspin présentent toutes un phénotype semblable avec des chromatides très condensées et nettement séparées les unes des autres. Ce n'est pas le cas dans la déplétion Aurora A, où les chromatides sont moins condensées et moins éloignées les unes des autres. Cette différence de phénotype n'encourage pas à relier le phénotype observé au cours du KO Aurora A uniquement à la délocalisation de l'Haspin. Cette délocalisation, plutôt que cause, pourrait être perçue comme une conséquence de la séparation précoce de chromatides sœurs.

b. Une fuite de la Shugoshin ?

La primo phosphorylation de CENP A S7 est entretenue par Aurora B, dont la déplétion conduit à une délocalisation de la Shugoshin sur les bras du chromosome. Il est tentant d'avancer que la délocalisation d'Aurora B, due à la déplétion d'Aurora A, conduit à une légère diminution de la Shugoshin 1 au centromère. Cette perte de la teneur en SGO 1 au centromère pourrait permettre d'expliquer la fragilité dans les mécanismes de maintien de la cohésion au centromère. La faible pénétrance du phénotype PSCS dans le cadre du KO Aurora A serait alors expliquée. La quantification du signal Shugoshin 1 dans la déplétion Aurora A n'a pas permis de mettre en évidence une perte du signal SGO1. La perte de cohésion n'est donc pas reliée à une fuite de la Shugoshin 1 en rapport avec la délocalisation d'Aurora B.

c. la tension au centromère ?

Aurora B et la Shugoshin 1 sont impliquées dans les mécanismes de capteurs de la tension exercée par les microtubules sur les kinétochores. Ces mécanismes permettent d'empêcher les attachements mérotéliques et syntéliques (kinétochore relié à deux centrosomes ou les deux kinétochores reliés uniquement au même centrosome). Le mécanisme de senseur de tension, encore mal compris, est basé sur des oscillations de la Shugoshin 1 qui accompagnent le mouvement du centromère sous tension. Aurora B, elle assure la prise en charge des attachements inadéquats.

La délocalisation d'Aurora B conduit probablement à une faiblesse de ce mécanisme de contrôle de l'attachement. Une forte tension exercée sur le centromère pourrait alors conduire

à une mauvaise protection des cohésines centromérique en raison d'un trop fort déplacement de la Shugoshin. PLK1 ou le subsite d'Aurora B au centromère pourrait alors phosphoryler les cohésines et provoquer la séparation (Figure 93).

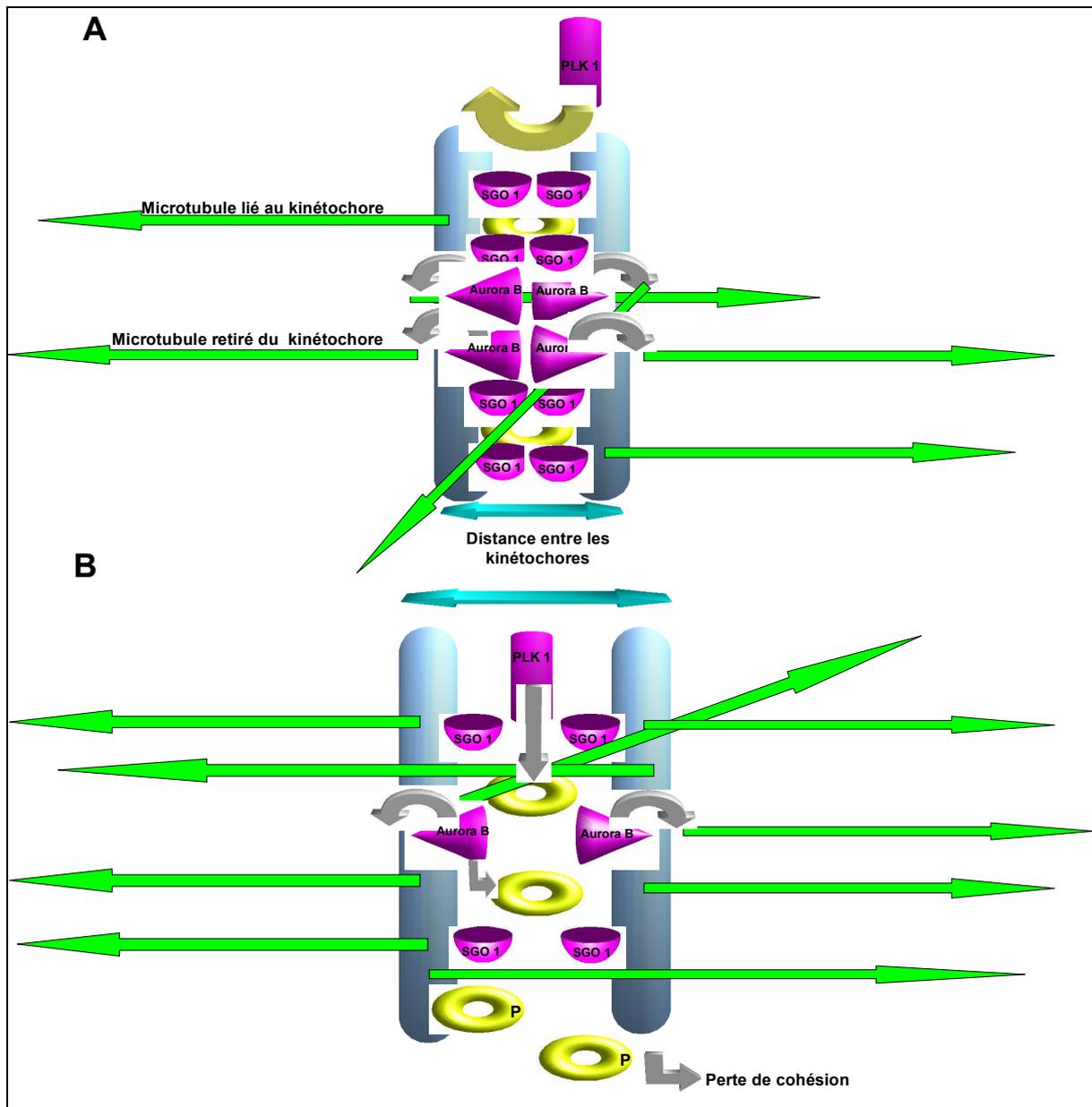


Figure 89 : Effet supposé du rôle de la tension exercé par les microtubules au kinétochore sur le maintien de la cohésion et conséquence d'une délocalisation d'Aurora B. En A : la dépolymérisation des microtubules liés de manière non convenable au kinétochore permet de maintenir une faible distance entre les deux chromatides. La Shugoshin 1 peut alors protéger efficacement les cohésine d'une phosphorylation par PLK1 ou Aurora B. En B : Une délocalisation d'Aurora B ne peut empêcher les liaisons anormales entre les kinétochore et les microtubules. La tension exercée augmente la distance entre les deux chromatides qui entraînent la Shugoshin. Les cohésines sont alors accessible à une phosphorylation par PLK 1 ou Aurora B.

Pour vérifier l'implication de la tension exercée par les microtubules il conviendrait de renouveler la déplétion d'Aurora A en l'absence et en présence de nocodazole. Cette molécule inhibe la polymérisation des microtubules. En sa présence il ne peut y avoir de tension exercée sur les kinétochore. L'apparition d'un phénotype PSCS en présence de nocodazole exclurait de fait l'implication des mécanismes de tension. Cette manipulation était projetée à la fin du stage et devait être mise en œuvre pour toutes les déplétions.

5. Rôle de la phosphorylation de CENP A S7

Malgré les difficultés liées à la dérive de la lignée témoin, les manipulations effectuées ont permis de confirmer l'implication de CENP A S7ph dans le maintien de la cohésion au centromère.

L'utilisation de la lignée HA CENP A S7A a pour effet l'apparition d'un phénotype PSCS morphologiquement comparable à celui obtenu lors de la déplétion Aurora A. Les protéines HDAC3, BUB 1, SGO 1 et Aurora A ne sont pas délocalisées. A l'inverse, Aurora B et Haspin sont délocalisées.

6. Tout ce qui touche à la cohésion touche Aurora B !

Dans l'ensemble des déplétions effectuées la protéine Aurora B est délocalisée sur les bras des chromatides. L'intégrité de la chaîne de signalisation au centromère semble donc nécessaire à sa bonne localisation. Le rôle fonctionnel d'Aurora B est délicat à comprendre, cette protéine intervenant dans de trop nombreux mécanismes. Sa déplétion conduit à un phénotype spectaculaire mais peu informatif en ce qui concerne la cohésion au centromère.

Curieusement, la déplétion d'Aurora B conduit à la délocalisation de la Shugoshin sur les bras du chromosome. A l'invitation de Christian Jaulin, Y.Watanabe, a présenté ses récents travaux au cours d'un séminaire à l'UMR 6061 au cours du stage. Ses résultats montraient que la kinase BUB 1 avait pour seul substrat l'histone H2A. En mimant la phosphorylation de l'histone H2A son groupe a réussi à localiser sur l'ensemble des bras du chromosome la Shugoshin 1 au cours d'une déplétion BUB1. Cela montre que cette phosphorylation est responsable de la localisation de SGO 1.

Pourquoi dans ce cas là, la Shugoshin est délocalisée au cours de la déplétion d'Aurora B, alors que celle-ci ne conduit pas à une délocalisation de BUB1 ?

On peut une nouvelle fois constater une synergie entre les activités de BUB1 et d'Aurora B sans pour autant pouvoir en dégager d'information pertinentes.

7. Haspin toujours coupable, ou souvent victime ?

Quelle que soit la déplétion envisagée, la kinase Haspin est toujours délocalisée. Elle se répand sur les chromatides tout comme Aurora B. En réalité la teneur en Haspin au sein de la cellule est trop faible pour que la protéine soit mise en évidence en immunofluorescence. Le marquage H3T3ph étudié ne témoigne que de l'activité de cette protéine. Rien n'indique *a priori* que le signal étudié reflète toujours la localisation de l'Haspin.

Sachant qu'Aurora B réalise une phosphorylation activatrice de l'Haspin (J.Higgins ; non publié) il ne peut être exclu, lors de la délocalisation d'Aurora B, que le marquage étudié ne soit le reflet que d'une activation accidentelle d'Haspin présente sur les bras.

Cette hypothèse pourrait expliquer la présence souvent observée d'un fin marquage H3T3ph le long et entre les bras du chromosome (Figure 94). Ce témoignage pourrait prouver la présence d'Haspin le long des bras qui serait activé par autophosphorylation. Toutefois ce signal reste faible et il peut s'agir d'un bruit de fond. Afin d'exclure la présence d'Haspin le long des bras du chromosome, il serait utile de tenter de greffer plusieurs tag HA ou des étiquettes comme la GFP (green fluorescent protein) afin de localiser non pas son activité mais sa présence physique.

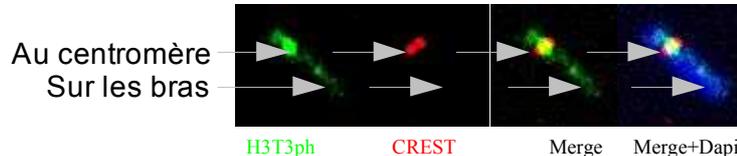


Figure 90 : l'Haspin serait elle aussi légèrement active sur les bras ?

L'hypothèse d'une activation accidentelle de l'Haspin par délocalisation d'Aurora B exclurait l'idée que la Shugoshin et Haspin interviennent dans une seule et même séquence de réaction. Elles pourraient intervenir dans deux voies différentes initiées par BUB1. La première de ces voies conduirait à une localisation physique de la Shugoshin 1 au centromère. La seconde, faisant intervenir Aurora A et conduisant à l'activation de l'Haspin.

III. Conclusion

1. Des protéines mobiles et des protéines exclusivement centromérique

Les manipulations réalisées au cours de ce stage ont permis de distinguer deux grandes classes de protéines dont l'activité peut être reliée à la fonction de cohésions. La première catégorie est celles ayant une localisation strictement centromérique. C'est le cas de BUB1, Aurora A et Shugoshin (et CENP-A). La deuxième classe est celles des protéines mobiles sur les chromatides. On y retrouve l'Haspin et Aurora B (et dans une moindre mesure SGO1 dans la déplétion Aurora B).

Le dialogue entre ces deux classes de protéines n'a pas toujours été clarifié aux cours des manipulations réalisées. C'est probablement entre BUB1 et Aurora B qu'il manque le plus d'éléments. Ces deux protéines ont un rôle majeur dans la localisation de la Shugoshin 1. Si la déplétion de BUB1 rend sa localisation impossible sur l'ensemble de la chromatide, la déplétion d'Aurora B la relocalise sur l'ensemble des bras. Il serait pertinent d'étudier le statut de la phosphorylation de H2A sur les bras du chromosome lors de la déplétion d'Aurora B. La présence de celle-ci sur les bras suggèrerait des localisations ectopiques de BUB1 indétectables en immunofluorescence. Mais comment ces localisations seraient-elles supprimées au cours de la prophase ?

L'un des enjeux de la chaîne de transduction du signal est de maintenir les protéines mobiles fixes au centromère. Il est vraisemblable que l'on puisse attribuer cette fonction à la phosphorylation de CENP S7. Aurora B en assurant l'entretien de cette phosphorylation reste localisée au centromère. Comme Aurora B est réputée assurer l'activation de l'Haspin cette dernière reste alors active uniquement au centromère.

2. Que peut-on déduire de façon certaine des manipulations réalisées

Les manipulations réalisées au cours de ce stage n'ont pas permis de dégager un modèle simple réellement crédible. Les seuls éléments pouvant être affirmés sont que la déacétylation d'H3K4 est l'élément le plus précoce de la chaîne étudiée. Elle est suivie par la diméthylation de cette lysine. Celle-ci permet directement ou indirectement de localiser BUB1 au centromère. Le dernier élément certain est que BUB1 initie de voies, l'une permettant le recrutement d'Aurora A au kinétochore, l'autre permettant de localiser la Shugoshin 1 sur la

face interne du centromère. La fonction de ces deux voies reste imprécise en raison de l'incompréhension de la relation entre Aurora B et de l'Haspin d'une part et Aurora B et Shugoshin 1 d'autre part.

3. Quel nouveau modèle peut-on proposer et tester.

Une hypothèse séduisante est que la voie impliquant la phosphorylation de CENP A S7 conduit à la localisation centromérique d'Aurora B. Le phénotype de PSCS observé est alors obtenu de manière indirecte. La perte de la localisation d'Aurora B influencerait sur les mécanismes de régulation des attachements des microtubules. Un excès de tension au centromère, entraînant localement la Shugoshin1, provoquerait une perte de la protection des cohésines et la séparation des chromatides. Cette voie permettrait, en outre d'assurer l'activation de l'Haspin au centromère.

La voie impliquant la Shugoshin 1 n'aurait alors plus aucun lien direct avec le maintien de la localisation des autres protéines (Figure 95).

Dans la déplétion Shugoshine la délocalisation d'Aurora B sur les bras pourrait être reliée à l'absence de constitution du Midbody qui est le siège de la localisation d'Aurora B dès l'anaphase.

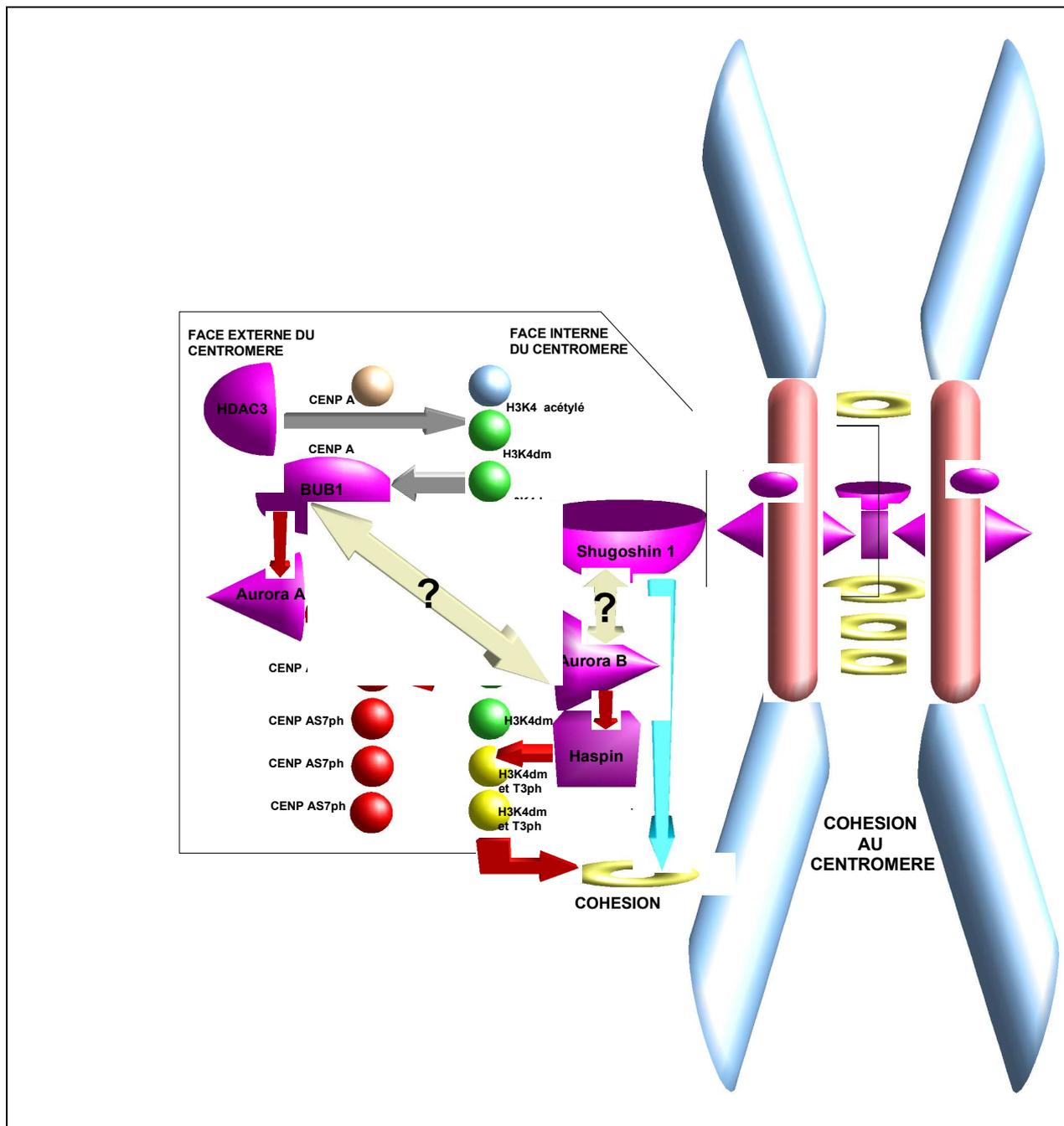


Figure 91 : Un nouveau modèle de voie de signalisation du signal de la cohésion au centromère qui peut être dégagé du travail effectué au cours de ce stage. Deux voies sont initiées après la localisation de BUB1 par la diméthylation de H3K4. Une première voie, en bleu, conduit à la localisation de la Shugoshin au centromère qui assure la protection des cohésines centromériques. La seconde voie, en rouge, conduit à la localisation d'Aurora A au centromère. Celle-ci concourt à la phosphorylation de CENP A S7 qui en étant entretenu par Aurora B force cette dernière à conserver une localisation centromérique. Aurora B peut ainsi réguler la liaison des microtubules et activer l'Haspin. La phosphorylation H3T3 qui en découle concourt par un mécanisme encore non compris à protéger la cohésion. Les relations entre les activités de BUB1 et d'Aurora B et la fonction d'Aurora b dans la localisation de la Shugoshin 1 restent mystérieuses.

4. Une séquence de réaction mais pas une chronologie...

L'étude du centromère sur des cellules en interphase est très délicate. Il est assez aisé de synchroniser les cellules à différentes phases du cycle. Mais il n'est pas évident, en appliquant les mêmes procédures que celle utilisée au cours du stage, que l'on puisse obtenir des signaux d'immunomarquage aisément interprétables. Les chromosomes sont décondensés et il n'est pas possible de distinguer un phénotype PSCS dans ces conditions. Les techniques de « peignage chromosomique », qui consistent à extraire les chromosomes et d'en étaler la fibre, sont en cours de mise au point au laboratoire par Laura Magnaghi-Jaulin. Ces protocoles ne pourraient qu'évaluer les modifications post traductionnelles des histones. Il est en effet illusoire de pouvoir suffisamment ménager les conditions de stringence pour espérer conserver les protéines associées au kinétochore.

Le travail effectué au cours du stage ne peut donc dresser que la séquence des réactions qui conduisent à la protection de la cohésion au centromère. Donner la chronologie précise des réactions demanderait un important travail complémentaire et la mise œuvre d'autres procédures.

Le travail effectué au cours de stage a permis de remettre en cause le modèle qui était testé. Il n'a, par contre, pas été possible de d'établir avec certitude une séquence de réactions solide. De nombreuses questions restent en suspend. Afin de pouvoir y répondre de nombreux projets sont en cours au laboratoire.

Ces projets étant en cours d'élaboration ou de réalisation et ne faisant pas partie intégrante du travail relaté dans ce mémoire, les éléments qui vont maintenant être décrit doivent rester

CONFIDENTIELS.

Perspectives

I. Définir les acteurs des modifications post-traductionnelles connues :

La déacétylation d'H3K4 est l'élément initiateur dans la séquence de réactions qui a été testée. Cette déacétylation conduit à une diméthylation de la lysine 4 de l'histone H3. La (ou les) méthyltransférase(s) responsable(s) de cette réaction n'est (ne sont) pas connue(s).

Actuellement, Rozenn Gallais post doctorante au sein de l'équipe, tente d'identifier cette méthyltransférase. A l'issue d'une revue bibliographique poussée des enzymes ont été retenues comme candidate. Des siARN ont ensuite été designés. Leurs efficacités ont été évaluées par qRTPCR. A la fin du stage, les manipulations de déplétion et d'étalement chromosomique commençaient à être réalisées.

II. Mettre en évidence de nouvelles modifications d'histones

Le cœur de la thématique du laboratoire n'est pas uniquement d'étudier la cohésion au centromère, mais de déchiffrer le code histone de la mitose. Actuellement l'équipe est focalisée sur les modifications post traductionnelles des histones au centromère. Il n'existe pas de carte exhaustive de ces modifications. L'un des projets les plus ambitieux de l'équipe est de dresser cette carte.

Il est projeté de définir l'ensemble des modifications d'histone par spectrométrie de masse. Cette manipulation suppose de pouvoir purifier les centromères. Cela est rendu possible grâce à la technique TAP Tag (Tandem affinity purification). En greffant une étiquette sur CENP A portant deux sites de liaison (l'un étant la protéine A qui se lie au immunoglobuline, l'autre

étant un peptide se liant à la calmoduline) séparés par une séquence portant le site de clivage par la protéase TEV on peut purifier en deux temps les centromères. La mise en œuvre de cette purification nécessite un grand nombre de cellules et la maîtrise des conditions de fragmentation de la chromatine afin d'obtenir une quantité suffisante de chromatine centromérique sans pollution par de la chromatine pericentromérique.

Les histones issus des nucléosomes purifiés pourront ensuite être analysés par spectrométrie de masse suivant un protocole complexe maîtrisé par une équipe avec laquelle une collaboration est envisagée.

Les nouvelles modifications qui seront alors identifiées pourront alors faire l'objet d'une étude plus poussée pour caractériser leurs rôles et implications.

III. Mieux connaître la fonction d'Aurora b et de Cenp AS7 phosphorylé.

Outre la relation entre Aurora B et BUB1 (que Yoshinori Watanabe tente de percer), une des questions qui reste en suspens à l'issue de ce travail est de relier la phosphorylation de CENP A S7ph et la formation du midbody. En effet, si on peut maintenant penser que le rôle de CENP A S7ph est de forcer la localisation d'Aurora B au centromère, on a constaté l'absence de formation du midbody sur les mitoses présentant le phénotype PSCS.

On peut alors émettre l'idée que la localisation centromérique d'Aurora B est nécessaire à la constitution du midbody. Dans ce cas, on peut supposer que l'un des rôles de CENP A S7ph est de spécifier la localisation du midbody. Comment alors s'effectue cette spécification si cette hypothèse est juste ?

La réflexion sur cette question n'en est encore qu'à un stade d'ébauche. Si cette hypothèse se révélait juste, ce serait encore un nouvel argument en faveur de l'existence d'un code histone de la mitose qui conduit le bon déroulement de la division.

Définitivement « le chromosome n'est pas en mitose comme un défunt au cours de ses obsèques, au centre de la cérémonie sans pour autant y participer activement ».

References

- Barber, TD., McManus, K., Yuen, KWY. et al. (2008). Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 3443-3448.
- Howard, P. (1953). Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage.. *Heredity* *6*, 261-273.
- Van den Heuvel, S. (2005). Cell-cycle regulation. *WormBook* , 1-16.
- [Alberts1989] Alberts, B., Bray, D., Lewis, j. et al. *Molecular biology of the cell*. Second edition.. . Garland publishing Inc, 1989.
- [Maillet1999] Maillet, M. *Biologie cellulaire*. . Masson, 1999.
- Lebart, M. and Mariani, J. (2009). *La régulation du cycle cellulaire*. , .
- Labbé, JC., Picard, A., Karsenti, E. et al. (1988). An M-phase-specific protein kinase of *Xenopus* oocytes: partial purification and possible mechanism of its periodic activation. *Dev. Biol.* *127*, 157-169.
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* *33*: 389-96)
- Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1982) Functionally homologous cell cycle control genes in fission yeast and budding yeast. *Nature* *327*: 31–35.
- Skladanowski, A., Bozko, P. and Sabisz, M. (2009). DNA structure and integrity checkpoints during the cell cycle and their role in drug targeting and sensitivity of tumor cells to anticancer treatment. *Chem. Rev.* *109*, 2951-2973.
- Kastan, MB. and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316-323.
- Watrin, E. and Peters, J. (2006). Cohesin and DNA damage repair. *Exp. Cell Res.* *312*, 2687-2693.
- Bucher, N. and Britten, CD. (2008). G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br. J. Cancer* *98*, 523-528.
- Pavlova, S. and Zakian, S. (2003a). Structural Proteins of the SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) Family and Their Role in Chromatin Reorganization. *Russian Journal of genetics* *39*, 1097-1111.

Swedlow, JR. and Hirano, T. (2003). The making of the mitotic chromosome: modern insights into classical questions. *Mol. Cell* *11*, 557-569.

M.D. Blower, B.A. Sullivan, and G.H. Karpen (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev Cell* *2*, 319-330.

Bettencourt-Dias, M. and Glover, DM. (2007). Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 451-463.

Arnal, I., Sassoon, I. and Tournebize, R. (2002). Dynamique du fuseau: vers une cible anti-cancéreuse. *M/S: médecine sciences* *18*, 1227-1235.

Vader, G. and Lens, SMA. (2008). The Aurora kinase family in cell division and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1786*, 60-72.

Delacourt-Larose, M. Nhung Hoang, TM. Molla, A. (2008). Survivine, la petite reine du complexe passager : *Chek-up* pour son dixième anniversaire. *M/S* *24*, 828-32.

Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T. et al. (2003a). CENP-A Phosphorylation by Aurora-A in Prophase I Is Required for Enrichment of Aurora-B at Inner Centromeres and for Kinetochore Function. *Developmental Cell*, *5*, 853-864.

Musacchio, A. and Salmon, ED. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Molecular cell biology* *8*, 379-386.

Rassoulzadegan, M., Grandjean, V., Gounon, P. et al. (2006). RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* *441*, 469-474.

Gabory, A. and Dandolo, L. (2005) Epigénétique et développement : L’empreinte parentale. *M/S* *21*, 390-5

Lerach S, Zhang W, Bao X, Deng H, Girton J, Johansen J, Johansen KM (2006) Loss-of-function alleles of the JIL-1 kinase are strong suppressors of position effect variegation of the *w^{m4}* allele in *Drosophila*. *Genetics*. 2006 Aug;173(4):2403-6.

Royo, H. and Cavallé, J. (2008). Non-coding RNAs in imprinted gene clusters. *Biol. Cell* *100*, 149-166.

Stefani, G. and Slack, FJ. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 219-230.

Heard, E., Chaumeil, J., Masui, O. et al. (2004). Mammalian X-chromosome inactivation: an epigenetics paradigm. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *69*, 89-102.

Allfrey, VG. and Mirsky, AE. (1964). Structural Modifications of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Science* *144*, 559.

Jenuwein, T. and Allis, CD. (2001). Translating the histone code. *Science* *293*, 1074-1080.

Strahl, BD. and Allis, CD. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Paulson, JR. and Taylor, SS. (1982). Phosphorylation of histones 1 and 3 and nonhistone high mobility group 14 by an endogenous kinase in HeLa metaphase chromosomes. *J. Biol. Chem.* 257, 6064-6072.

Adams, RR., Maiato, H., Earnshaw, WC. et al. (2001). Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochore disjunction, and chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 153, 865-880.

Johansen, KM. and Johansen, J. (2006). Regulation of chromatin structure by histone H3S10 phosphorylation. *Chromosome Res.* 14, 393-404.

Dai, J., Sullivan, BA. and Higgins, JMG. (2006). Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev. Cell* 11, 741-750.

Higgins, JMG. (2010). Haspin: a newly discovered regulator of mitotic chromosome behavior. *Chromosoma* 119, 137-147.

Sullivan, BA. and Karpen, GH. (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1076-1083.

Eot-Houllier, G., Fulcrand, G., Watanabe, Y. et al. (2008). Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 22, 2639-2644.

Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T. et al. (2003b). 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.

Pavlova, S. and Zakian, S. (2003b). Structural Proteins of the SMC (Structural Maintenance of Chromosomes) Family and Their Role in Chromatin Reorganization. *Russian Journal of Genetics* 39, 1097-1111.

Barbero, J. (2009). Cohesins: chromatin architects in chromosome segregation, control of gene expression and much more. *Cellular Molecular Life Science* , .

Peters, J., Tedeschi, A. and Schmitz, J. (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes Dev.* 22, 3089-3114.

Schmitz, J., Watrin, E., Lénárt, P. et al. (2007). Sororin is required for stable binding of cohesin to chromatin and for sister chromatid cohesion in interphase. *Curr. Biol.* 17, 630-636.

Guacci, V., Hogan, E. and Koshland, D. (1994). Chromosome condensation and sister chromatid pairing in budding yeast. *J. Cell Biol.* *125*, 517-530.

Waizenegger, IC., Hauf, S., Meinke, A. et al. (2000). Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell* *103*, 399-410.

Ivanov, D. and Nasmyth, K. (2005). A topological interaction between cohesin rings and a circular minichromosome. *Cell* *122*, 849-860.

Zhang, N., Kuznetsov, SG., Sharan, SK. et al. (2008). A handcuff model for the cohesin complex. *J. Cell Biol.* *183*, 1019-1031.

Kitajima, S., Kawashima, S. and Watanabe, Y. (2004a). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *NATURE* *427*, 510-517.

Takata, H., Matsunaga, S., Morimoto, A. et al. (2007). PHB2 protects sister-chromatid cohesion in mitosis. *Curr. Biol.* *17*, 1356-1361.

Black, B., Jansen, L., Maddox, P. et al. (2007b). Centromere Identity Maintained by Nucleosomes Assembled with Histone H3 Containing the CENP-A Targeting Domain. *Molecular Cell* *25*, 309-322.

Kitajima, TS., Kawashima, SA. and Watanabe, Y. (2004b). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* *427*, 510-517.

Liste des figures

Figure 1 : Représentation du cycle cellulaire présentant l'enchaînement des quatre phases du cycle -----	p 15
Figure 2 : représentation de l'activité des complexes cyclines/CDK au cours du cycle cellulaire -----	p 17
Figure 3 : implication des voies de réparation de l'ADN dans le contrôle du cycle cellulaire. -- -----	p 19
Figure 4 : représentation de l'interphase et des cinq phases de la mitose. -----	p 21
Figure 5 : représentation d'un nucléosome constitué d'un octamère de protéines histones sur lequel s'enroule une molécule d'ADN. -----	p 21
Figure 6 : les états de condensation de l'ADN -----	p 22
Figure 7 : structure schématique de la condensine -----	p 23
Figure 8 : modèle d'organisation de la chromatine au centromère montrant l'asymétrie de répartition des nucléosomes H3 et Cenp A-----	p 23
Figure 9 : Organisation du fuseau mitotique entre les deux centrosomes -----	p 24
Figure 10 : Représentation schématique du centrosome -----	p 24
Figure 11 : Le cycle du centrosome -----	p 25
Figure 12 : Organisation d'un microtubule -----	p 25
Figure 13 : L'instabilité dynamique des microtubules -----	p 26
Figure 14 : Le <i>kinétochore attachment checkpoint</i> -----	p 28
Figure 15 : Modifications post traductionnelles connues des histones et des variants CENP-A et H2A.X -----	p 32
Figure 17: Illustration par immunofluorescence de la localisation de H3S10ph -----	p 34
Figure 18 : Microphotographie illustrant l'intérêt de l'utilisation du marquage H3S10ph pour discriminer les cellules mitotiques des cellules en interphase -----	p 34
Figure 19 : Illustration par immunofluorescence de la localisation de H3T3ph sur un étalement de chromosome métaphasique -----	p 35
Figure 20 : Immunofluorescence montrant en vert, le marquage H3K4dm sur l'ensemble du chromosome à l'exclusion de la région péricentromérique -----	p 35
Figure 21 : Structure d'un dimère SMC -----	p 37
Figure 22 : Vue éclatée du complexe cohésine -----	p 38
Figure 23 : modèle à un seul anneau de Nasmyth -----	p 40
Figure 24 : Le modèle de Zhang -----	p 41
Figure 25 : Représentation de la suppression des cohésions sur les bras du chromosome au cours de la prophase -----	p 42
Figure 26 : Cascade de réaction envisagée et testée au cours du stage -----	p 45
Figure 26 : déplétion HDAC 3-----	p 55
Figure 27 : Marquage d'H3S10ph lors de la déplétion d'HDAC 3-----	p 56
Figure 27: Marquage d'H3K4dm lors de la déplétion d'HDAC 3 -----	p 56
Figure 28 : Marquage de BUB1 lors de la déplétion d'HDAC 3 -----	p 57
Figure 29 : Quantification de la fluorescence de BUB1 dans la déplétion HDAC3 -----	p 57
Figure 30 : Marquage de la Shugoshin 1 lors de la déplétion d'HDAC 3 -----	p 58
Figure 31 : Marquage d'Aurora A lors de la déplétion d'HDAC 3 -----	p 58
Figure 32 : Diagramme montrant la nette diminution du rapport intensité de fluorescence Aurora A/CREST dans des cellules déplétées en HDAC3 par rapport aux cellules témoins----- -----	p 59
Figure 33 : Marquage de CENPA S7ph lors de la déplétion d'HDAC 3 -----	p 59

Figure 34 : Marquage d'Aurora B lors de la déplétion d'HDAC 3 -----	p 60
Figure 35 : Marquage d'H3T3ph lors de la déplétion d'HDAC 3 -----	p 60
Figure 36 : Marquage de la chromatine par le DAPI présentant la déplétion témoin et la déplétion de la protéine BUB1 -----	p 61
Figure 37 : Distance entre les kinétochores dans les cellules témoins et les cellules déplétées BUB1 -----	p 61
Figure 39: Marquage d'H3K4dm et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de BUB1 -----	p 62
Figure 40 : Marquage de BUB1 lors de la déplétion de BUB1	p 62
Figure 41: Marquage de la Shugoshin 1 lors de la déplétion de BUB1	p 63
Figure 42: Marquage d'Aurora A et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de BUB1	p 64
Figure 43: Marquage d'Aurora B lors de la déplétion de BUB1 -----	p 65
Figure 44 : Marquage d'H3T3ph lors de la déplétion de BUB1-----	p 65
Figure 45 : microphotographie présentant le marquage de l'ADN par le DAPI sur des cellules témoins et sur des cellules déplétée en Shugoshin 1 -----	p 66
Figure 46 : Marquage H3S10ph lors de la déplétion de la Shugoshin 1 -----	p 66
Figure 47 : Marquage de H3K4dm et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de la Shugoshin 1 -----	p 67
Figure 48: Marquage de BUB1 lors de la déplétion de la Shugoshin 1 -----	p 67
Figure 49: Marquage de la Shugoshin 1 lors de sa déplétion -----	p 68
Figure 50: Marquage d'Aurora A et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de la Shugoshin 1 -----	p 69
Figure 51: Marquage de CENP A S7ph et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de la Shugoshin 1 -----	p 69
Figure 52 : Marquage d'Aurora B lors de la déplétion de la Shugoshin -----	p 70
Figure 53 : Marquage H3T3ph lors de la déplétion de la Shugoshin 1 -----	p 70
Figure 54 : La déplétion d'Aurora A engendre de nombreux phénotypes -----	p 71
Figure 55 : Marquage H3S10ph lors de la déplétion d'Aurora A-----	p 72
Figure 56 : La quantification du signal H3K4dm rapporté au signal CREST lors de la déplétion d'Aurora A -----	p 72
Figure 57 : Marquage BUB1 lors de la déplétion d'Aurora A -----	p 73
Figure 58 : Marquage de la Shugoshin 1 et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion d'Aurora A -----	p 73
Figure 59 : Quantification du rapport intensité du signal Aurora A / Signal CREST lors de la déplétion d'Aurora A -----	p 74
Figure 60 : Quantification de la fluorescence de CENPA S7ph par rapport à la fluorescence du signal CREST lors de la déplétion d'Aurora A -----	p 74
Figure 61 : Marquage d'Aurora B lors de la déplétion d'Aurora A -----	p 75
Figure 62 : Marquage H3T3ph lors de la déplétion d'Aurora -----	p 75
Figure 63 : Western blot présentant le mode de sélection du clone -----	p 77
Figure 64 : Marquage H3S10ph sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène-p	78
Figure 65 : Marquage H3K4dm sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène -p	79
Figure 66 : Marquage de BUB 1 sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène-p	79
Figure 67 : Marquage de la Shugoshin 1 sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène -----	p 80
Figure 68 : Marquage d'Aurora A sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène -----	p 81

Figure 69 : Marquage d'Aurora B sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène ---	
-----	p 81
Figure 70 : Marquage d'H3T3ph sur les lignées lors de la déplétion du CENP A endogène ----	
-----	p 82
Figure 71 : Aspect des mitose sur une lame témoin et dans le cadre de la déplétion d'Aurora B	
-----	p 83
Figure 72: Marquage d'H3S10ph lors de la déplétion d'Aurora B	p 83
Figure 73: Marquage d'H3K4dm lors de la déplétion d'Aurora B -----	p84
Figure 74: Marquage de BUB1 lors de la déplétion d'Aurora B -----	p 84
Figure 75: Marquage de la shugoshin 1 lors de la déplétion d'Aurora B -----	p 85
Figure 76: Marquage d'Aurora A lors de la déplétion d'Aurora B -----	p 85
Figure 77: Marquage de CENP A S7ph lors de la déplétion d'Aurora B et quantification de sa fluorescence -----	p 86
Figure 78 : Mise en évidence par Western-Blot de la protéine Aurora B dans le cadre de la déplétion	p 86
Figure 79: Marquage H3T3ph lors de la déplétion d'Aurora B -----	p 87
Figure 80 : Aspect des mitoses lors de la déplétion témoin (siLuc) et lors de la déplétion de l'Haspin -----	p 87
Figure 81: Marquage H3S10ph lors de la déplétion de l'Haspin -----	p 88
Figure 82 : Quantification de la fluorescence du marquage H3K4dm au centromère. -----	p 88
Figure 83 : Marquage de BUB1 lors de la déplétion de l'Haspin -----	p 89
Figure 84: Marquage Shugoshin 1 lors de la déplétion de l'haspin -----	p 89
Figure 85: Marquage Aurora A et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de l'Haspin -----	p 90
Figure 86: Marquage de CENP A S7ph et quantification de sa fluorescence lors de la déplétion de l'Haspin -----	p 90
Figure 87: Marquage Aurora B lors de la déplétion de l'Haspin	p 91
Figure 88 : Marquage H3T3ph lors de la déplétion de l'Haspin -----	p 91
Figure 89 : Effet supposé du rôle de la tension exercé par les microtubules au kinétochore sur le maintien de la cohésion et conséquence d'une délocalisation d'Aurora B -----	p 101
Figure 90 : l'Haspin serait elle aussi légèrement active sur les bras ? -----	p 103
Figure 91 : Un nouveau modèle de voie de signalisation du signal de la cohésion au centromère -----	p106

Liste des tableaux

Tableau 1 : tableau présentant les séquences des siRNA utilisé au cours des manipulations relatées dans ce mémoire, les fournisseurs ainsi que les temps d'incubation retenus. -----	p 48
Tableau 2 : composition du gel de séparation en fonction du maillage choisi. -----	p 49
Tableau 3 : liste des anticorps primaire utilisé en Western Blot et en immunofluorescence ----	p 51
Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires utilisé en Western Blot (WB) et en Immuno fluorescence (IF) avec leurs dilutions respectives et leurs fournisseurs -----	p 52
Tableau 5: Résumé des données de l'immunofluorescence pour la déplétion HDAC3 -----	p 93
Tableau 6: La déplétion de BUB1 donne des résultats conforme à ceux attendus -----	p 94
Tableau 7: La déplétion de la Shugoshin -----	p 94
Tableau 8: La déplétion Aurora A -----	p 95
Tableau 9: Résumé des résultats obtenus lors de la déplétion du CENP A endogène sur la lignée HA CENP A S7A -----	p 95
Tableau 10: La déplétion d'Aurora B -----	p 96
Tableau 11 : Synthèse des résultats obtenus dans le cadre de la déplétion de l'Haspin -----	p 96