



Analyse fonctionnelle de la phosphorylation du co-chaperon moléculaire BAG3 et de son action dans la morpho-dynamique des cellules mitotiques

Thèse

Carole Luthold

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Carole Luthold, 2019

Résumé

La division cellulaire constitue le principe fondamental de la vie et repose sur des changements architecturaux cellulaires spectaculaires. Plusieurs de ces changements sont dirigés par le remodelage précis de structures mécano-sensibles à base d'actine. De plus en plus d'évidences suggèrent une relation étroite entre le contrôle de qualité des protéines et la régulation spatiotemporelle de la dynamique des structures d'actine entre autres, par l'intermédiaire de mécanismes de séquestration ou de dégradation des protéines. Les petites protéines de choc thermique (HSPB) sont des chaperons moléculaires qui font partie intégrante du réseau de contrôle de qualité des protéines, lesquelles contribuent à l'homéostasie du protéome. Ces chaperons émergent comme des modulateurs des structures à base d'actine en conditions physiologiques et comme des protecteurs de l'intégrité de ces structures en conditions de stress. Selon le modèle prévalent, l'assemblage des HSPB en structures oligomériques dynamiques leur confère leur fonction dans la séquestration de composantes cellulaires pour prévenir une agrégation protéique non-spécifique. Néanmoins, leur mode d'action demeure encore élitif : le fait que certaines HSPB ne formeraient pas d'oligomères suggère un autre mécanisme d'action pour ces HSPB. C'est le cas de HSPB8, qui forme un complexe avec le co-chaperon moléculaire BAG3. Les prémices des travaux de cette thèse ont été la découverte d'un nouveau rôle pour ce complexe au cours de la mitose : BAG3, d'une manière dépendante de son association avec HSPB8, facilite le remodelage drastique du cytosquelette d'actine requis pour le positionnement du fuseau mitotique et la ségrégation adéquate des chromosomes. L'objectif de cette thèse était d'identifier le mode de régulation de la fonction mitotique de BAG3-HSPB8 et de disséquer les mécanismes moléculaires impliqués qui facilitent le remodelage du cytosquelette d'actine mitotique.

Les travaux de cette thèse apportent des évidences que la modulation des fonctions mitotiques de BAG3 est dépendante de sa phosphorylation par la kinase mitotique CDK1 sur des résidus spécifiques ; Thr285 et Ser386. Ces phosphorylations lui confèrent une activité différentielle sur l'arrondissement cellulaire versus le positionnement du fuseau mitotique. De plus, BAG3 serait phosphorylée dès la phase G2/M sur le résidu Ser195, ce qui modulerait son enrichissement en périphérie du noyau à la transition G2/M. Nos résultats suggèrent que ces phosphorylations seraient impliquées dans la modulation d'associations protéiques différentielles, selon les phases du cycle cellulaire. En outre, l'entrée des cellules en mitose est marquée par l'association de BAG3 avec des protéines du cytosquelette d'actine, telle que cortactine, ainsi qu'avec des acteurs du contrôle de qualité des protéines, notamment le récepteur autophagique p62/SQSTM1 et la déacétylase HDAC6. De manière cruciale, la phosphorylation et les associations protéiques mitotiques de

BAG3 sont dépendantes de sa liaison à HSPB8. Nos résultats suggèrent un modèle selon lequel le complexe BAG3-HSPB8 régule l'assemblage de p62/SQSTM1 en corps supramoléculaires qui pourraient offrir une plateforme pour isoler et réguler l'assemblage de complexes protéiques impliqués dans le remodelage des structures d'actine mitotiques. Via ce mécanisme d'action, BAG3-HSPB8 limiterait la polymérisation de l'actine branchée dépendante d'Arp2/3, en modulant négativement l'activité déacétylase de HDAC6 sur son substrat cortactine, un processus qui faciliterait l'arrondissement mitotique.

Ainsi, nos résultats mettent en avant un rôle central pour la phosphorylation de BAG3 dans la modulation de son action mitotique, en étroite collaboration avec ses partenaires HSPB8 et p62/SQSTM1. L'ensemble de nos données contribue ainsi à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels le complexe chaperon BAG3-HSPB8 orchestre le remodelage dynamique des structures cellulaires mitotiques à base d'actine et facilite les changements de forme des cellules requis pour la progression mitotique. Ces travaux ont également permis l'identification de nouvelles cibles moléculaires du complexe chaperon, entre autres impliquées dans la dynamique du cytosquelette d'actine. Ces travaux offrent de nouvelles pistes d'investigations intéressantes concernant le développement de pathologies associées à une dérégulation du complexe BAG3-HSPB8, notamment dans la progression tumorale.

Abstract

Cell division is the fundamental principle of life and is based on spectacular cellular architectural changes. Many of them are driven by the accurate remodeling of mechanosensitive actin-based structures. Growing evidence suggests a close relationship between protein quality control and the spatiotemporal regulation of actin remodeling, through mechanisms that would promote protein sequestration and/or degradation. Small heat shock proteins (HSPBs) are molecular chaperones that are an integral part of the protein quality control network, which contribute to maintain proteome homeostasis. They emerge as modulators of actin-based structures under physiological conditions and as guardians of the integrity of cytoskeletal structures under stress conditions. According to the prevailing model, the assembly of HSPBs into large oligomers confers them with the ability to sequester cellular components and prevent unspecific aggregation of damaged proteins. Nevertheless, their mode of action remains elusive: the observation that some HSPBs do not form oligomers suggests another mechanism of action for these HSPBs. This is the case for HSPB8, which forms a complex with the molecular co-chaperone BAG3. The working model of this thesis is based on the initial discovery in our laboratory of a new role for this complex during cell division: BAG3 facilitates the drastic remodeling of the actin cytoskeleton required for spindle positioning and proper segregation of chromosomes, in a manner that requires HSPB8. The aim of this thesis was to identify the mechanisms whereby such a function of the BAG3-HSPB8 chaperone complex is regulated, and to investigate how the complex can facilitate mitotic actin cytoskeleton remodeling.

The work presented here provides evidence that the modulation of BAG3 mitotic functions depends on its phosphorylation by the mitotic kinase CDK1 at specific residues, Thr285 and Ser386, which confers differential activity on cell rounding versus mitotic spindle positioning. Evidence also suggests that BAG3 would be phosphorylated earlier in the G2/M phase, at Ser195, which would modulate its perinuclear enrichment. Our results suggest that these phosphorylations could be involved in defining specific protein associations, in a cell-cycle dependent manner. In addition, we found that mitotic entry is marked by the stimulation of BAG3's association with proteins that organize the actin cytoskeleton, such as cortactin, as well as with protein quality control actors, notable, the autophagic receptor p62/SQSTM1 and the deacetylase HDAC6. Critically, BAG3 phosphorylation and its associations with mitotic protein partners rely on its binding to HSPB8. The results suggest a model whereby the BAG3-HSPB8 complex would regulate the molecular assembly of p62/SQSTM1 into mitotic bodies that could provide a platform to sequester and facilitate protein complex assembly implicated in mitotic actin cytoskeleton remodeling. Via this

mechanism, BAG3-HSPB8 could limit branched actin polymerization that depends on Arp2/3 activity, by down-modulating HDAC6 deacetylase activity towards its substrate cortactin, a process that would facilitate mitotic cell rounding.

Thus, our results highlight a central role of BAG3 phosphorylation in the modulation of its mitotic action, in close relationship with its partners HSPB8 and p62. Altogether, our data contribute to a better understanding of the molecular mechanisms by which the BAG3-HSPB8 chaperone complex orchestrates the dynamic remodeling of mitotic cell structures and thereby, facilitates the cell shape changes required for mitotic progression. This study has also identified new molecular targets of the chaperone complex there are, among others, involved in the dynamics of the actin cytoskeleton. Thus, this work offers new avenues of investigation regarding the development of pathologies associated with a deregulation of the BAG3-HSPB8 complex, particularly in tumor progression.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	iv
Table des matières.....	vi
Liste des figures et illustrations.....	xi
Liste des abréviations	xiv
Remerciements.....	xix
Avant-propos.....	xxi
Introduction	1
Chapitre 1 : Mise en contexte bibliographique	4
1.1. Le cytosquelette d'actine et ses protéines associées : régulation dynamique d'une architecture complexe.	4
1.1.1. Régulation du cytosquelette d'actine par les protéines se liant à l'actine (ABP).	6
1.1.2. Formation et régulation des réseaux d'actomyosine.	7
1.1.3. Les structures complexes d'actine, les forces contractiles et la mécanotransduction : aux commandes des processus cellulaires dépendants de la dynamique du cytosquelette.	10
1.2. Le contrôle de qualité des protéines et l'intégrité des structures à base d'actine.	15
1.2.1. Les acteurs du contrôle de qualité des protéines.	16
1.2.1.1. Généralités sur le contrôle de qualité des protéines et pathologies associées.	16
1.2.1.2. Les petites protéines de choc thermique HSPB et le cytosquelette d'actine.	20
1.2.1.2.1. Séquestration des protéines endommagées et chaperons de la famille HSPB.	21
1.2.1.2.2. Mode de régulation par phosphorylation et modulation du cytosquelette d'actine par les HSPB.	23
1.2.1.3. Systèmes de dégradation ciblée des protéines : focus sur l'autophagie sélective. ..	26
1.2.1.3.1. L'ubiquitination des protéines, bien plus qu'un signal de dégradation.	27
1.2.1.3.2. Système de dégradation des composants cellulaires par autophagie sélective.	28
1.2.1.4. Exploration de la multifonctionnalité de la protéine p62/SQSTM1 : l'oligomérisation détermine sa fonction.	31
1.2.1.4.1. p62/SQSTM1, séquestrer pour mieux dégrader : une protéine essentielle pour la formation contrôlée d'inclusions de protéines ubiquitinées.	33
1.2.1.4.2. Les « p62 bodies » : des centres organisateurs de la signalisation grâce à leur formation par séparation de phase ?.....	35
1.2.1.4.3. Régulation de p62 et pathologies associées.	38
1.2.2. Exemples de diverses implications du contrôle de qualité des protéines dans la dynamique et l'organisation cytosquelette d'actine.	41
1.3. BAG3 et HSPB8 : émergence d'une fonction de ce complexe dans la supervision de l'architecture et du remodelage du cytosquelette d'actine ?	44
1.3.1. HSPB8 : une HSPB atypique au sein de sa famille de chaperons moléculaires.	44

1.3.2. Généralités sur le co-chaperon moléculaire BAG3.	47
1.3.2.1. Expression de BAG3 : de la physiologie aux pathologies.	48
1.3.2.2. BAG3, une protéine d'échafaudage possédant de multiples domaines et motifs d'interaction protéine-protéine.	50
1.3.2.3. Modulation de BAG3 par phosphorylation : un mécanisme de régulation de la protéine encore peu étudié.	52
1.3.2.4. BAG3 : une plateforme signalétique modulant potentiellement l'activité de différentes enzymes et couplant l'association à leurs substrats ?.....	53
1.3.3. Le complexe chaperon BAG3-HSPB8 dans le processus d'autophagie sélective.....	55
1.3.3.1. Induction de l'autophagie sélective par le complexe BAG3-HSPB8.....	56
1.3.3.2. Implication du complexe BAG3-HSPB8 dans le ciblage des protéines ubiquitinées à l'agrésome.	57
1.3.4. Le contrôle de qualité des protéines du cytosquelette d'actine par BAG3.....	58
1.3.4.1. L'autophagie induite par la tension mécanique : BAG3 coordonne l'autophagie sélective assistée par les chaperons (CASA).....	58
1.3.4.2. Importance fonctionnelle de BAG3 dans la modulation de structures cellulaires à base d'actine.....	60
1.3.4.2.1. Influence sur la polymérisation et la dynamique de l'actine.....	60
1.3.4.2.2. Adhésion, migration et motilité.	61
1.3.4.2.3. Stabilité et intégrité du disque Z.	64
1.4. Contribution de BAG3-HSPB8 dans les changements drastiques de l'architecture du cytosquelette d'actine pendant la mitose qui guide le positionnement du fuseau mitotique.....	66
1.4.1. CDK1, la kinase majeure de la phase M qui contrôle l'entrée et la sortie de la mitose. 70	
1.4.1.1. Contrôle de l'entrée en mitose par l'activation de CDK1 : un rôle fondamental de sa liaison aux cyclines et de la modulation de sa phosphorylation.....	71
1.4.1.2. Inactivation de CDK1 via la dégradation des cyclines pour assurer la transition métaphase-anaphase.	72
1.4.1.3. Importance fonctionnelle de l'identification de nouveaux substrats de CDK1.....	75
1.4.2. Remodelage du cytosquelette d'actine pendant la mitose : un guide pour le positionnement du fuseau mitotique.....	75
1.4.2.1. L'arrondissement cellulaire.....	77
1.4.2.1.1. Le désassemblage des adhésions focales.	77
1.4.2.1.2. La formation, la rigidité et la tension du cortex.....	79
1.4.2.2. Les fibres de rétraction et le nuage sous-cortical d'actine.	81
1.4.2.3. L'établissement de complexes d'adhésions mitotiques : un concept émergeant. ...	83
1.4.3. Le contrôle de qualité des protéines et le cycle cellulaire.	84
1.4.4. Un rôle pour le complexe chaperon BAG3-HSPB8 dans la dynamique du cytosquelette d'actine, l'orientation fuseau mitotique et la séparation correcte des chromosomes pendant la mitose.	86
1.5. Hypothèse et Objectifs :	89
Chapitre 2	91
2.1. Avant-propos.....	92
2.2. Résumé.....	93

2.3. Abstract	94
2.4. Introduction	95
2.5. Results	97
2.5.1. BAG3 is specifically phosphorylated at T285 at mitotic entry.	97
2.5.2. BAG3 phosphorylation at T285 is regulated by CDK1.....	100
2.5.3. BAG3 phosphorylation mutants cannot rescue the mitotic defects in cells depleted of BAG3.	101
2.5.4. The regulation of BAG3 and p62 by CDK1 shows mutual dependence.....	104
2.5.5. BAG3 phosphorylation regulates the molecular assembly of p62 bodies at mitotic entry.	106
2.5.6. MIBS are high-ordered structures containing K63 polyubiquitin chains, which are modulated by CDK1	109
2.6. Discussion	113
2.7. Materials and methods	121
2.8. References	127
2.9. Supporting information captions and supplementary methods	133
Chapitre 3: Analyse fonctionnelle comparative de la phosphorylation de BAG3 sur T285, S386 et S195 de la transition G2/M à la mitose.....	135
3.1. Introduction	136
3.2. Le résidu S386 de BAG3 est phosphorylé par la kinase CDK1 pendant la mitose et régule l'arrondissement des cellules mitotiques et l'assemblage moléculaire des MIBS.....	136
3.2.1. BAG3 est phosphorylée sur la S386 de l'entrée des cellules en mitose jusqu'à la transition métaphase-anaphase de manière dépendante de l'activité de la kinase CDK1.	136
3.2.2. La phosphorylation de BAG3 sur la S386 facilite l'arrondissement des cellules mitotiques et la formation des MIBS mais n'a pas d'impact sur le positionnement du fuseau mitotique.	141
3.3. Rôle du résidu S195 et de la kinase Aurora A dans la régulation de la localisation de BAG3 en G2/M.	145
3.4. BAG3 s'associe avec des partenaires protéiques différents en G2/M et pendant la mitose.	149
3.5. Conclusion.....	152
Chapitre 4: Identification de HDAC6 comme une cible du complexe BAG3-HSPB8 dans le remodelage des structures mitotiques à base d'actine.....	154
4.1. Avant propos	155
4.2. Introduction	155
4.3. Analyse de l'interaction fonctionnelle entre BAG3 et HDAC6 pendant les phases G2/M et mitotique.	156
4.4. L'acétylation de cortactine est augmentée dans les cellules mitotiques et son association à HDAC6 est régulée à la baisse par le complexe BAG3-HSPB8.....	160

4.5. Régulation de la polarisation du nuage sous-cortical d'actine par le complexe BAG3-HSPB8-p62 et implication des activités d'Arp2/3 et de HDAC6.....	164
4.6. Rôle de HDAC6 dans le processus d'arrondissement mitotique régulé par le complexe BAG3-HSPB8-p62.....	174
4.7. Un mutant non-acétylable de cortactine phénocopie la déplétion de BAG3-HSPB8 sur l'arrondissement cellulaire tandis qu'un mutant acétyl-mimétique restaure le phénotype.	177
4.8. Conclusion.....	180
4.9. Figures supplémentaires.....	181
Chapitre 5 : Matériels et méthodes des chapitres 3, 4 et annexe 2.....	183
5.1. Vecteurs d'expression, infection, adénovirus et baculovirus recombinants.....	183
5.2. Lignées cellulaires, culture cellulaire, synchronisation et traitements.....	184
5.3. Transfection et siARN.....	185
5.4. Immunoprécipitation et immunobuvardage de type « Western ».	187
5.5. Anticorps et produits chimiques.....	188
5.6. Immunofluorescences et PLA (« proximity ligation assay »).....	189
5.7. Microscopie.....	190
Chapitre 6: Discussion générale.....	194
6.1. La phosphorylation site-spécifique de BAG3 : un élément clé de sa régulation fonctionnelle au cours du cycle cellulaire.....	195
6.1.1. Rôle potentiel de la phosphorylation sur S195 dans le recrutement de BAG3 dans la région périnucléaire pendant la phase G2/M.....	196
6.1.1.1. Modulation de la localisation de HDAC6 par BAG3 via la phosphorylation du résidu S195 ?.....	196
6.1.1.2. Initiation de la phosphorylation mitotique de BAG3 par CDK1-cycline B1 pendant la phase G2/M à la région périnucléaire et centrosomale ?.....	197
6.1.1.3. Modulation de l'activité chaperon de HSPB8 dépendante de la phosphorylation sur le résidu S195 de BAG3 ?.....	197
6.1.2. Les fonctions mitotiques différentielles de BAG3 : mécanismes potentiels de régulation par la phosphorylation sur T285 et S386.....	199
6.2. La phosphorylation de BAG3 dans la modulation d'une plateforme d'interaction couplant la déacétylase HDAC6 à son substrat cortactine pendant la mitose.....	203
6.2.1. Le complexe BAG3-HSPB8 en tant que plateforme d'interaction pour moduler l'assemblage de complexe signalétique mitotique.....	204
6.2.2. L'assemblage des « p62 bodies » mitotiques dépendant de la phosphorylation de BAG3 et de HSPB8 en tant que plateforme signalétique.....	208
6.2.3. L'assemblage des « p62 bodies » mitotiques : voies alternatives possibles.....	212
6.3. Perspectives possibles de ce projet.....	213
6.3.1. BAG3 : une plateforme d'activation de CDK1 à la phase G2/M ?.....	213

6.3.2. L'arrondissement des cellules mitotiques : un rôle de BAG3 dans le désassemblage des adhésions focales ?	214
6.3.3. BAG3 et le mécanisme de la CASA en réponse aux tensions mécaniques: un contrôle de qualité des protéines du cytosquelette d'actine qui ne serait pas restreint aux cellules musculaires ?	216
Conclusion.....	220
Bibliographie.....	222
Annexe 1: A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis	255
Annexe 2: Le complexe chaperon BAG3-HSPB8 influence l'activation de la kinase CDK1 en mitose.	287

Liste des figures et illustrations

Chapitre 1 :

Figure 1.1 : Régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine et de son organisation par les ABP.

Figure 1.2 : Régulation spatio-temporelle de la contractilité par la signalisation des Rho GTPases.

Figure 1.3 : Structure d'un dimère de myosine II.

Figure 1.4 : Organisation des structures d'actomyosine dans le sarcomère, les fibres de stress et le cortex cellulaire.

Figure 1.5 : Le réseau de la protéostasie assisté par les chaperons moléculaires.

Figure 1.6 : Fonction de « *holdase* » des HSPB.

Figure 1.7 : Modèle du mode d'action de HSPB1, par modulation de sa phosphorylation, dans la régulation de la polymérisation d'actine et la motilité cellulaire

Figure 1.8 : Schéma de la voie d'induction de l'autophagie, étapes de formation et de dégradation de l'autophagosome.

Figure 1.9 : Structure de p62, domaines et partenaires d'interaction.

Figure 1.10 : Les domaines PB1, LIR et UBA de p62 engagent la séquestration des substrats ubiquitinés dans l'autophagosome.

Figure 1.11 : Principales modifications post-traductionnelles de p62 essentielles pour la régulation de ses fonctions.

Figure 1.12 : Structure de BAG3 et partenaires d'interaction.

Figure 1.13 : Sites de phosphorylation connus de BAG3 et les kinases associées.

Figure 1.14 : Modèle du mécanisme par lequel BAG3-HSPB8 aiderait au ciblage de protéines poly-ubiquitinées à la machinerie autophagique.

Figure 1.15 : Modèle de formation de l'agrésome dépendante de BAG3.

Figure 1.16 : Représentation schématique du cycle cellulaire avec les complexes CDK/cyclines majeurs qui assurent la transition entre chaque phase.

Figure 1.17 : Les étapes de la mitose et les changements morphologiques cellulaires drastiques associés.

Figure 1.18 : Schéma récapitulatif de la régulation de l'activité du complexe CDK1-cycline B de la phase G2 à la transition métaphase-anaphase et les acteurs moléculaires impliqués.

Figure 1.19: Méthode de synchronisation cellulaire.

Chapitre 2:

Figure 2.1: BAG3 is phosphorylated at T285 residues at early mitosis.

Figure 2.2: Regulation of BAG3 phosphorylation at T285 by CDK1.

Figure 2.3: The non-phosphorylatable and phospho-mimetic BAG3-GFP mutants cannot rescue spindle dynamics and mitotic rounding in BAG3-depleted cells.

Figure 2.4: Regulation of BAG3 and p62 by CDK1 shows mutual dependence.

Figure 2.5: The molecular assembly of p62 into MIBS depends on BAG3 phosphorylation and HSPB8.

Figure 2.6: MIBS' numbers and size change during mitosis and their assembly is regulated by CDK1.

Figure 2.7: MIBS recruit K63 polyubiquitin chains and show a distinctive arrangement.

Figure S2.1: Analyses of BAG3 phosphorylated residues by AP-MS.

Figure S2.2: (A) Mitotic kinase inhibitors-induced mitotic delays. (B) Maintenance of BAG3 phosphorylation requires CDK1 activity in mitosis.

Figure S2.3: (A) The non-phosphorylatable BAG3-GFP mutants can rescue aggresome formation in BAG3-depleted cells. (B) HSPB8 facilitates mitotic BAG3 phosphorylation at T285.

Figure S2.4: MIBS are detected in normal mouse C2C12 muscles cells and in parental CCL2 HeLa cells.

Chapitre 3:

Figure 3.1 : Identification des sites de phosphorylation S385 et S386 durant la mitose par spectrométrie de masse.

Figure 3.2 : BAG3 est phosphorylée sur S386 en mitose.

Figure 3.3 : BAG3 est phosphorylée sur S386 de l'entrée des cellules en mitose jusqu'à la transition métaphase-anaphase.

Figure 3.4 : Le résidu S386 de BAG3 est phosphorylé directement par la kinase CDK1.

Figure 3.5 : La mutation du résidu S386 de BAG3 en alanine non phosphorylable n'affecte pas le positionnement du fuseau mitotique mais induit des défauts d'arrondissement des cellules pendant la mitose.

Figure 3.6 : La mutation du résidu S386 de BAG3 en alanine non phosphorylable perturbe l'assemblage moléculaire des « *p62 bodies* » pendant la mitose.

Figure 3.7 : La mutation de la S195 de BAG3 en alanine non phosphorylable et l'inhibition de l'activité d'Aurora A diminuent l'enrichissement périnucléaire de BAG3 en G2/M.

Figure 3.8 : BAG3 possède des partenaires distincts en phase G2/M et pendant la mitose.

Chapitre 4 :

Figure 4.1 : La déplétion de BAG3 interfère avec la relocalisation cytoplasmique de HDAC6 en G2/M.

Figure 4.2 : L'association de BAG3 avec ses partenaires p62, HDAC6 et son substrat cortactine est différentielle en phase G2/M et dans les cellules mitotiques.

Figure 4.3 : L'acétylation des protéines est augmentée pendant la mitose par rapport aux cellules asynchrones et l'inhibition de HDAC6 a un effet moindre dans les cellules mitotiques sur l'acétylation de cortactine.

Figure 4.4 : Le complexe BAG3-HSPB8 contribue à diminuer l'interaction HDAC6-cortactine pendant la mitose.

Figure 4.5 : La déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 induit une dérégulation de la dynamique polarisée du nuage sous-cortical d'actine associée à des défauts de positionnement du fuseau mitotique et de la progression mitotique.

Figure 4.6 : L'inhibition de l'activité d'Arp2/3 par le CK666 normalise les mouvements erratiques du nuage d'actine sous-cortical et les défauts de positionnement du fuseau mitotique dans les cellules suivant la déplétion de BAG3.

Figure 4.7 : La tubacine, un inhibiteur sélectif de HDAC6, induit des défauts de formation du nuage d'actine sous-cortical.

Figure 4.8 : L'inhibition de l'activité de HDAC6, avec une faible dose de tubacine, normalise les mouvements erratiques du nuage ainsi que les défauts de positionnement du fuseau mitotique en réponse à la déplétion de BAG3.

Figure 4.9 : La déplétion de BAG3-HSPB8-p62 induit des défauts d'arrondissement mitotiques qui sont normalisés par l'inhibition de HDAC6.

Figure 4.10 : L'inhibition d'Arp2/3 corrige les défauts d'arrondissement dans les cellules mitotiques déplétées en BAG3.

Figure 4.11 : Le mutant acétyl-mimétique de cortactine normalise les défauts d'arrondissement mitotique induit par la déplétion de BAG3, tandis que le non-acétylable mime les défauts.

Figure S4.1 : Mesure de l'efficacité de la déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 par WB.

Figure S4.2 : L'inhibition de l'activité de HDAC6 normalise les défauts d'arrondissement mitotiques associés à la déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 dans les cellules HeLa parentales CCL2.

Chapitre 6 :

Figure 6.1 : Modèle hypothétique des fonctions du recrutement périnucléaire de BAG3 pendant la phase G2/M.

Figure 6.2 : Dynamique en temps réel du nombre et du volume des MIBS p62 pendant la progression mitotique.

Annexe 2 :

Figure A2.1 : L'association de BAG3 avec CDK1 et son substrat filamine A est modulée de façon différentielle pendant la phase G2/M et la mitose.

Figure A2.2 : La déplétion de BAG3 et l'inhibition partielle de CDK1 conduisent à un retard de la progression mitotique et induisent des défauts d'arrondissement mitotique.

Figure A2.5 : La déplétion de BAG3 ou HSPB8 interfère avec le niveau de phosphorylation inhibitrice sur le résidu Y15 de CDK1.

Liste des abréviations

3'UTR	<i>3' UnTranslated Region</i>
ABP	<i>Actin Binding Proteins</i>
AMOTL1/ 2	<i>Angiomotin-like protein 1 ou 2</i>
APC/C	<i>Anaphase Promoting Complex/Cyclosome</i>
aPKC	<i>Atypical Protein Kinase C</i>
Arp2/3	<i>Actin related proteins 2 and 3</i>
AS	<i>Asynchrone</i>
ATG	<i>AuTophaGy related gene</i>
ATP	<i>Adenosine TriPhosphate</i>
BAG	<i>Bcl2-associated athanogen</i>
BAG3	<i>Bcl2-associated athanogen 3</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BIS	<i>Bcl-2 interacting death suppressor</i>
CAIR-1	<i>CAI stressed-1</i>
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
CASA	<i>Chaperone-Assisted Selective Autophagy</i>
CCT	<i>Chaperonin Containing T-complex polypeptide</i>
Cdc20	<i>Cell division cycle protein 20</i>
Cdc42	<i>Cell division cycle protein 42</i>
Cdh1	<i>Cdc20 homolog 1</i>
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>
CEP170	<i>CEntrosomalProtein of 170 kDa</i>
CHIP	<i>Carboxyl terminus of Hsc70-Interacting Protein</i>
CK1/2	<i>Casein Kinase 1 or 2</i>
CQP	<i>Contrôle de Qualité des Protéines</i>
DEPDC1B	<i>DEP Domain Containing 1B</i>
Dia	<i>Diaphanous</i>
ECT2	<i>Epithelial Cell Transforming 2</i>
EMT	<i>Epithelio-Mesenchymal Transition</i>
Eps8	<i>Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8</i>
ERK	<i>Extracellular-Related Kinase</i>
ERM	<i>Ezrine-Radixine-Moésine</i>
EWSR1	<i>EWS RNA binding protein 1</i>
FA	<i>Focal Adhesion</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FR	<i>Fibre de rétraction</i>

FRAP	<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GAPDH	<i>GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase</i>
GDP	<i>Guanosine DiPhosphate</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GTP	<i>Guanosine TriPhosphate</i>
H2B	<i>Histone 2 B</i>
HDAC6	<i>Histone DeAcetylase 6</i>
HSC70	<i>Heat Shock Cognate 70</i>
HSF-1	<i>Heat Shock Factor 1</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HSP70	<i>Heat Shock Protein of 70kDa</i>
HSPB	<i>Heat Shock Protein family B</i>
HSPB1/8	<i>Heat Shock Protein family B member 1 or 8</i>
Htt43Q	<i>Huntigtin 43 glutamin</i>
IF	<i>Immunoflorescence</i>
IKK	<i>Inhibitor of kappa B Kinase</i>
ILK	<i>Integrin-Linked Kinase</i>
IP	<i>Immunoprécipitation</i>
IPV	<i>Ile-Pro-Val</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KIR	<i>Keap1 Interacting Region</i>
LATS1	<i>Large Tumor Suppressor Kinase 1</i>
LC3	<i>Microtubule-associated protein 1A/1B-Light Chain 3</i>
LGN	<i>Leucine-glycine-asparagine</i>
LIR	<i>LC3 Interacting Region</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
mDia1	<i>Diaphanous-related formin1</i>
MEC	<i>Matrice Extra Cellulaire</i>
MEKK3	<i>Mitogen activated protein kinase kinase 3</i>
MIBS	<i>Mitotic Inclusion Body Structures</i>
MISP	<i>Mitotic Interactor and Substrate of PLK1</i>
MLC	<i>Myosin Light Chain</i>
MMP-2	<i>Matrix Metallo Proteinase-2</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MTOC	<i>MicroTubules Organization Center</i>

mTORC1	<i>Mammalian Target Of Rapamycin Complex 1</i>
Myo10	<i>Myosine X</i>
NBR1	<i>Next to BRCA1 gene 1 protein</i>
NEBD	<i>Nuclear Envelope Break Down</i>
NF-kB	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
PB1	<i>Phox et Bem 1</i>
PDZGEF2	<i>PDZ domain-containing Guanine nucleotide Exchange Factor 2</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase</i>
PKA	<i>Protein Kinase A</i>
PKC	<i>Protein Kinase C delta</i>
PLC	<i>Phospholipase C gamma</i>
PLK1	<i>Polo-Like Kinase 1</i>
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rap1	<i>Ras-proximate-1 ou Ras-related protein 1</i>
RAPGEF6	<i>Rap Guanine nucleotide Exchange Factor 6</i>
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>
Rho	<i>Ras homologous</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein Kinase</i>
SCFFbxw5	<i>Skp1-Cul1-F-box F-Box and WD Repeat Domain Containing 5</i>
SEM	<i>Standart Error of the Mean</i>
SH2/3	<i>Src Homology 2 or 3 Domain</i>
SQSTM1	<i>SeQueSTosoMe 1</i>
SSH1	<i>SlingSHot 1</i>
SYNPO2	<i>SYNaptoPOdine-2</i>
TAZ	<i>Tafazzine</i>
TRAF6	<i>Tumornecrosis factor Receptor-Associated Factor 6</i>
TRIM21	<i>TRIPartite Motif-containing protein 21</i>
TSC1/2	<i>Tuberous SCLerosis 1/2</i>
UBA	<i>UBiquitin Association</i>
UBL	<i>UBiquitin-Like</i>
ULK1	<i>Unc-51-Like autophagy activating Kinase 1</i>
UNC-45	<i>UNC coordinated mutant number 45</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild Type</i>
YAP	<i>Yes-Associated Protein</i>
ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homeobox 1</i>

*À mon étoile, Irène ; à mes parents, Nadine
et Rémy,*

*« It always seems impossible until it's done »,
Nelson Mandela*

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier ma directrice de thèse, Dre Josée N. Lavoie pour m'avoir accueillie et intégrée dans son laboratoire pendant près de 6 années. Je vous remercie d'avoir partagé avec moi votre amour pour la science, votre rigueur scientifique à toutes épreuves et votre expertise, particulièrement en microscopie. Merci également de m'avoir appris à développer mon esprit critique. J'ai vivement apprécié votre disponibilité et nos très nombreuses (et longues !) discussions théoriques ou techniques qui m'ont clairement épanoui scientifiquement. Je me sens vraiment grandie de cette expérience ! Pour finir, sans vous, je ne serais pas à Québec, alors merci mille fois de m'avoir permis de vivre mon expérience de vie la plus marquante jusqu'ici, tant professionnellement que personnellement.

Je remercie aussi Margit Fuchs et Herman Lambert, les deux professionnels de recherche de choc de la team Lavoie : comme je vous l'ai déjà dit, si par chance j'arrivais à avoir mon lab, il me faut « une Giti » et « un Herman ». Merci du fond du cœur à vous deux, pour votre bienveillance et cette atmosphère de travail si agréable dont vous êtes en grande partie responsable et dont on a pu bénéficier pendant toutes ces années. Giti, merci de m'avoir transmis ton savoir-faire en culture cellulaire et en microscopie en cellule vivante. Je te suis reconnaissante également pour ton œil critique et ta rigueur légendaire. Merci aussi pour ton écoute et tes bons conseils tant professionnels que personnels. Je souhaite adresser des remerciements particuliers à Herman, notre « papa » du lab. Je ne sais pas comment te remercier pour toute l'aide que tu m'as apportée et d'avoir toujours répondu présent à n'importe lesquels de mes questions, de mes requêtes ou de mes casse-têtes biochimiques. Merci aussi pour ton éternel sourire, ton positivisme et ta bonne humeur.

Je tiens ensuite à remercier l'ensemble des membres, passés et présents, du laboratoire Lavoie. À Émilie, alias Tata Miloune, Alex et Marc Antoine. Votre sourire et votre enthousiasme sont communicatifs. Merci Soso de m'avoir accueillie et promenée ma première fin de semaine, tu m'as sauvée ! Et merci évidemment pour tous les autres supers moments qui ont suivi et toutes nos discussions tant personnelles que professionnelles ! À Claire, petit Clairon, ma coloc qui m'a supporté pendant 5 longues années en plus d'être collègue...merci pour les gâteaux et petits plats, les soirées Netflix, les soirées improvisées ou non dans notre chez nous...et j'en passe ! Merci pour ton soutien de tous les jours ! Ca a été une belle période dont je garde de précieux souvenirs ! Enfin, mention spéciale à Alice, alias ma Georgette, mon binôme, tout comme BAG3 et HSPB8, on

se complète et on effectue mieux nos fonctions quand nous sommes ensemble ! Je ne sais même pas par où commencer et comment te remercier pour tous ces merveilleux moments, tant au laboratoire qu'à l'extérieur ! Merci pour nos discussions scientifiques interminables, nos virées improvisées, nos weekends spa automnaux, nos traditionnels « vendredi tout est permis »...et j'en passe ! Merci merci merci pour ton support inconditionnel, même à distance ! Et je conclurais par...à notre futur lab !!!

Je tiens aussi à remercier les amis que je me suis faite « icitte », ma famille Québécoise. Mel, JC, Maxou, Gaëlle, Alex, Aksam, Manu, Matthieu, Maeva, Kevin, Alice, Laurent, Lauriane, Vincent, Imène, Khalid, Françoise, Noah, Phil, Cornélia, Myriam, Clémence, Jon, Anne Ju... sans vous, ma vie à Québec n'aurait pas eu la même saveur ! Merci pour votre écoute, votre soutien, votre folie, votre bonne humeur et votre joie de vivre ! Je ne sais pas comment j'aurais fait sans vous à mes côtés pendant ce doc ! Tout simplement, merci pour ces 6 merveilleuses années remplies de souvenirs, tous aussi précieux les uns que les autres !!

Je n'oublie pas mes amies de France, Mel, Manon, Jul', Mari et Mimi, qui pendant 6 ans m'ont soutenue à distance. Mes Fraizys d'amour, déjà 15 ans que vous partagez ma vie...qu'importe le continent, nos liens sont toujours aussi fort ! Tant de chemin parcouru à vos côtés...merci d'avoir cru en moi et d'avoir été présente pour moi malgré l'Atlantique entre nous !

Mon Boubou que j'aime, ma petite sœur, merci d'avoir été si compréhensive, d'être venue passer du temps avec moi à Québec, pour tous nos fous rires, tous ces messages et notre complicité ! Merci aussi à toute ma famille, Tata, Tonton, Claude, Sandrine, Geoffrey, Pépère et Mémère, pour tout ce que vous avez toujours fait pour moi ! Votre amour m'a réconforté même pendant les tempêtes québécoises !

Enfin, je remercie mes parents et leur dédicace cet ouvrage. Sans votre amour, votre soutien sans limite peu importe l'océan entre nous et votre foi infaillible en moi, je n'en serais pas là. Merci pour votre patience infinie et votre immense compréhension. Vous êtes mes piliers et des exemples de force de la nature. Je n'ai pas de mots pour vous remercier à votre juste valeur.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Bonne lecture !

Avant-propos

À mon arrivée au laboratoire, différents travaux avaient permis d'établir que le complexe chaperon BAG3-HSPB8 était impliqué dans la progression mitotique. J'ai d'ailleurs eu la chance de participer activement à ces derniers, qui ont montré que le complexe chaperon BAG3-HSPB8 module des structures à base d'actine qui dirigent le positionnement du fuseau mitotique et la progression en mitose des cellules cancéreuses. L'article issu de ces recherches, où je suis co-deuxième auteure, a été publié dans le journal PLoS Genetics et est disponible à l'*annexe 1* (Fuchs, M., Luthold, C., Guilbert, M., Varlet, A.A., Lambert, H., Jetté, A., Elowe, S., Landry, J., Lavoie, J.N. (2015) **A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis.** PLoS Genet. 23;11(10): e1005582).

Cependant le rôle précis et le mode d'action de BAG3-HSPB8 dans ce processus cellulaire n'étaient pas compris. **Les travaux de cette thèse de doctorat avaient donc pour but de contribuer à la compréhension des mécanismes moléculaires qui régulent les fonctions du complexe chaperon et d'explorer le mode d'action de celui-ci sur la modulation spatio-temporelle de la morphodynamique des structures à base d'actine lors de la division cellulaire.**

Dans un premier temps, j'ai identifié la phosphorylation de BAG3 sur un résidu spécifique par la kinase majeure de la mitose CDK1 (« *Cyclin Dependent Kinase* ») comme un élément modulateur clé de sa fonction mitotique sur le remodelage cellulaire. Cette phosphorylation, ainsi que HSPB8 et CDK1, contribuent à l'assemblage moléculaire de p62/SQSTM1 (« *Sequestosome 1*»), une protéine importante du CQP, dans des structures mitotiques hautement ordonnées contenant des chaînes poly-ubiquitinées K63 que nous avons appelées MIBS. Ces travaux sont présentés en *chapitre 2* de cette thèse et font l'objet d'un article dont je suis première auteure, intitulé : « **Cdk1-mediated Phosphorylation of BAG3 Promotes Mitotic Cell Remodelling and the Molecular Assembly of Mitotic p62 bodies « MIBS »** ». Les co-auteurs de cet article sont Herman Lambert, Margit Fuchs, Solenn M. Guilbert, Marc-Antoine Rodrigue, Alice Anaïs Varlet, Aline Dumas, Luc Vallières, Amélie Fradet-Turcotte and Josée N. Lavoie.

Les résultats présentés au chapitre 2 ont mis en lumière l'importance de la phosphorylation de BAG3 sur un site spécifique, T285, pour réguler son action mitotique. Dans le *chapitre 3*, j'ai analysé l'impact fonctionnel de deux autres sites qui sont régulés par les signaux mitotiques : S195

et S386. Ces résultats ont apporté des preuves que BAG3 est phosphorylée sur plusieurs sites, qui lui confère une action mitotique différentielle, ainsi qu'une fonction potentielle pendant la phase G2.

Enfin, le second objectif de mon doctorat, qui fait l'objet du *chapitre 4*, était de caractériser le mécanisme moléculaire par lequel le complexe chaperon BAG3-HSPB8 pourrait réguler le remodelage dynamique des structures à base d'actine pendant la mitose. Les résultats obtenus indiquent que BAG3-HSPB8, en association avec p62/SQSTM1, modulerait l'activité de la déacétylase HDAC6 sur une de ses cibles, cortactine, impliquée dans la dynamique du cytosquelette d'actine. Une telle modulation semble être nécessaire pour faciliter le remodelage spatio-temporel de structures d'actine pendant la mitose. Les expériences réalisées contribueront à un deuxième article en préparation dont je serais co-première auteure avec Alice-Anaïs Varlet.

En complément de ce chapitre, l'*annexe 2* présente des résultats qui suggèrent que BAG3-HSPB8 pourrait également moduler l'activation de la kinase mitotique CDK1.

L'ensemble de ces travaux n'aurait pas pu voir le jour sans la contribution des co-auteurs cités ci-dessus.

Introduction

Le flux de la vie repose sur la division cellulaire, qui d'une part, chez un organisme unicellulaire aboutit à un nouvel organisme et d'autre part, chez un organisme multicellulaire, assure son développement initial, puis sa croissance et enfin le remplacement des cellules lésées au sein des tissus. Le cycle cellulaire consiste donc en la duplication de l'ADN et de l'entièreté des composants subcellulaires, suivie de leur répartition dans deux cellules filles au moment de la division, nommée aussi mitose, afin d'obtenir deux cellules identiques. La mitose est donc un événement complexe qui doit être exécuté avec une grande fidélité pour assurer la stabilité génomique. De nombreux processus complexes existent pour contrôler avec précision la fidélité de ces divisions et les restreindre uniquement dans des conditions de croissance optimales. Aucun système n'étant parfait, des erreurs de division peuvent se produire malgré tout et conduisent à la production de cellules filles avec un nombre aberrant de chromosomes, un état connu sous le nom d'aneuploïdie (Jaarsveld et Kops 2016; Sansregret et Swanton 2017). L'aneuploïdie, associée au vieillissement et à la tumorigénèse (Naylor et van Deursen 2016), constitue une caractéristique fréquente des cancers, apparaissant dans près de 70% des tumeurs humaines solides (Duijf, Schultz, et Benezra 2013). Sans omettre qu'une des bases de la formation d'une tumeur est l'échappement d'une cellule aux signaux limitant normalement sa division et aboutissant donc à sa division cellulaire incontrôlée. De ce fait, la compréhension des mécanismes qui dictent la division cellulaire demeure encore aujourd'hui l'un des plus grands défis de la biologie cellulaire et de la recherche sur le cancer.

Il est bien établi que le cytosquelette d'une cellule au cours de la mitose subit des changements morpho-dynamiques spectaculaires et rapides (dans une fenêtre de temps restreinte d'en moyenne une heure). Le réseau de microtubules s'assemble pour former le fuseau mitotique et assure la capture et la séparation (ou ségrégation) des chromosomes pendant la mitose. Au vu de sa fonction, il apparaît évident que des défauts dans son assemblage, mais aussi de son positionnement ou de son orientation, provoquent des erreurs de ségrégation des chromosomes conduisant à l'aneuploïdie. Outre un rôle dans le maintien primordial de l'intégrité du génome dans les cellules filles, le positionnement et l'orientation du fuseau mitotique définissent aussi l'axe de division cellulaire. Ceci constitue un paramètre crucial de la division au sein des tissus et par conséquent, assure la morphogénèse, le renouvellement et l'intégrité tissulaire (Siller et Doe 2009; Cadart et al. 2014; Petridou et Skourides 2014; Chanet et al. 2017; Pietro, Echard, et Morin 2016). Par exemple, il est connu que les divisions cellulaires orientées sont importantes pour le développement des tubules allongés du rein. Des évidences laissent croire que des divisions mal orientées conduisent à une

maladie rénale kystique chez des modèles animaux, indiquant un rôle central de l'orientation du fuseau mitotique pour la morphogenèse épithéliale (Simons et Walz 2006). Le contrôle et la régulation du fuseau mitotique ont donc fait l'objet d'études intensives depuis sa description initiale dans une cellule animale par Flemming en 1882 (Petry 2016).

En revanche, le cytosquelette d'actine commence seulement à émerger comme un régulateur fondamental de l'orientation et du positionnement du fuseau mitotique. Chaque étape de la division requiert une régulation spatio-temporelle fine du remodelage dynamique des structures d'actine par des mécanismes qui demeurent cependant peu connus. Notamment, l'entrée des cellules en mitose s'accompagne de la réorganisation du cytosquelette d'actine conduisant à l'arrondissement des cellules et à l'établissement d'un cortex d'actomyosine rigide (Maddox et Burridge 2003). Des études *in cellulo* et *in vivo* chez la souris et la drosophile ont démontré que la perturbation du cortex d'actine mitotique par des drogues telles que la latrunculine A ou la cytochalasine D, génère des défauts d'orientation du fuseau mitotique (Pietro, Echard, et Morin 2016). Ceci démontre bien l'existence d'une interrelation fonctionnelle entre la régulation du cortex d'actomyosine et le fuseau mitotique. Ainsi, disséquer les mécanismes régulateurs de la morpho-dynamique des cellules mitotiques s'avère être un enjeu de taille pour approfondir notre compréhension des processus qui orchestrent la division des cellules et guident l'orientation et le positionnement du fuseau mitotique.

En outre, les mécanismes par lesquels la cellule assure le maintien de l'intégrité de structures à base d'actine soumises à des cycles d'assemblage/désassemblage répétitifs pendant la mitose, demeurent méconnus. L'existence de mécanismes de contrôle de qualité protéique (CQP) régulant l'intégrité de telles structures a été proposée, mais constitue un domaine peu exploré à ce jour (Baird et al. 2014). Néanmoins, bien que les études soient éparpillées, des évidences indiquent que le CQP participerait activement tant au maintien de structures à base d'actine qu'à la facilitation de leurs changements morpho-dynamiques, de manière générale et pendant la mitose. Entre autres, la dégradation spatio-temporelle de certaines protéines régulatrices et architecturales associées à l'actine a été impliquée dans la progression mitotique. Par exemple, la dégradation spatio-temporelle d'un régulateur important du cytosquelette d'actine, la petite GTPase RhoA, facilite les étapes tardives de la division qui sont requises pour la séparation physique des cellules filles (Belaid, Cerezo, et al. 2013). Il est intéressant de noter que de surcroît, la progression du cycle cellulaire est supervisée par la dégradation d'importants régulateurs du cycle cellulaire (Sivakumar et Gorbsky 2015). En résulte une régulation spatio-temporelle extrêmement précise du contenu

moléculaire de la cellule. Les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire et du CQP pourraient donc collaborer étroitement dans les cellules pour assurer une division cellulaire optimale.

Historiquement, les laboratoires des Drs. Lavoie et Landry se sont intéressés aux fonctions des chaperons moléculaires qui sont des acteurs clés du CQP. Ils ont notamment été des pionniers dans la découverte d'un rôle pour les chaperons HSPB (« *small Heat Shock Protein* » ou HSPB), notamment de HSPB1 alors connu sous le nom de HSP27, dans la régulation de la dynamique des structures d'actine (Lavoie, Hickey, et al. 1993; Lavoie, Gingras-Breton, et al. 1993; Lavoie et al. 1995). Depuis quelques années, l'attention s'est particulièrement portée sur le chaperon moléculaire HSPB8 qui forme un complexe avec le co-chaperon moléculaire BAG3 (« *Bcl2-associated athanogen 3* »). Tant de manière indépendante, qu'en tant que complexe, ces protéines émergent comme des modulateurs du cytosquelette d'actine dans divers contextes physiologiques et pathologiques, incluant la migration, l'adhésion ou encore le maintien de l'intégrité des structures contractiles d'actomyosine dans les cellules musculaires. Les recherches de notre laboratoire se sont donc orientées vers l'élucidation des mécanismes moléculaires dépendants du complexe chaperon BAG3-HSPB8 qui faciliteraient la modulation du cytosquelette d'actine. Puisqu'une cellule en division subit des changements drastiques de la morpho-dynamique du cytosquelette d'actine et que les mécanismes qui dictent ces changements sont peu compris, nous avons choisi de travailler avec ce modèle d'étude fascinant qu'est la mitose pour disséquer l'implication potentielle du complexe BAG3-HSPB8 dans la modulation spatio-temporelle de la dynamique du cytosquelette d'actine.

Dans le chapitre 1, nous introduirons les protéines et les mécanismes moléculaires qui dictent l'architecture du cytosquelette d'actine et assurent la mécanotransduction cellulaire (paragraphe 1.1). Les notions de base et les concepts émergents concernant le CQP et ses acteurs, ainsi que leur implication dans le remodelage et l'intégrité du cytosquelette d'actine, seront présentés (paragraphe 1.2). Nous décrirons ensuite les fonctions connues, et celles suggérées, du chaperon HSPB8 et celles de son co-chaperon BAG3 dans le contrôle de qualité des protéines, la signalisation et le remodelage de l'actine, et nous discuterons des questions actuellement soulevées par ces travaux (paragraphe 1.3). Finalement, nous explorerons les mécanismes moléculaires impliqués dans le remodelage des structures à base d'actine qui dirigent la division cellulaire et les questions non résolues dans ce domaine (paragraphe 1.4). Nous finirons par exposer l'hypothèse de recherche et les objectifs associés (paragraphe 1.5).

Chapitre 1 : Mise en contexte bibliographique

1.1. Le cytosquelette d'actine et ses protéines associées : régulation dynamique d'une architecture complexe.

De nombreux processus biologiques fondamentaux comme la morphogénèse, la division cellulaire, la migration ou encore le trafic intracellulaire, sont étroitement reliés au cytosquelette d'actine. Particulièrement abondant sous la membrane plasmique, région référée comme le cortex cellulaire, le cytosquelette d'actine détermine la forme des cellules et confère entre autres à la cellule une stabilité mécanique. En effet, il fournit un support physique qui permet d'ancrer la membrane plasmique aux cellules périphériques grâce à différents types de jonctions et à la matrice extracellulaire (MEC) via les adhésions focales (« *Focal Adhesion* » ou FA). Les FA consistent en l'assemblage de complexes multi-protéiques associés à la membrane plasmique et engagent l'interaction avec la MEC grâce à la famille des protéines transmembranaires des intégrines (Kuo 2014). Celles-ci recrutent de nombreuses protéines dans ces complexes, appelées « adhésomes », assurant la connexion physique avec le cytosquelette d'actine (Kuo 2014; Geiger et Zaidel-Bar 2012). Le cytosquelette d'actine constitue une structure hautement dynamique dont l'organisation a la capacité d'être remodelée en quelques secondes dans le but de générer des réponses appropriées aux stimuli exogènes et endogènes. Les signaux bidirectionnels, entre le cytosquelette et les récepteurs membranaires, ainsi que les protéines d'adhésion, régulent le remodelage dynamique du cytosquelette d'actine.

Les cellules au sein des tissus sont soumises à des forces mécaniques causées par des changements physiques de leur microenvironnement, comme la rigidité de la MEC. Elles génèrent en retour des forces mécaniques internes comme lors de la contraction des structures contractiles d'actomyosine. La capacité de réponse et d'adaptation cellulaire à l'environnement physique est une propriété universelle et essentielle pour maintenir la fonctionnalité de la cellule. Une déformation et des changements conformationnels sont induits par les signaux mécaniques au niveau de protéines ou de complexes protéiques dits « mécano-sensibles » et modifient les signaux biochimiques émis via l'activation de voies de signalisation qui vont permettre à la cellule de répondre de manière adaptée aux stimuli. Ce processus, nommé mécanotransduction, est responsable de la conversion des signaux mécaniques qu'ils soient externes ou internes à la cellule en signaux biochimiques. La mécanotransduction implique cependant des « appareils moléculaires » de détection (Boateng et al., 2009). Certains constituants subcellulaires ont été clairement identifiés comme modules

mécanotransducteurs, tels que les canaux ioniques qui sont activés par étirement de la membrane plasmique (Diz-Muñoz, Fletcher, et Weiner 2013). Aussi, puisque les FA établissent une communication bidirectionnelle entre le cytosquelette d'actine intracellulaire et la MEC, celles-ci jouent ainsi un rôle clé dans la mécanotransduction (Bershadsky et al. 2006; Kuo 2014). Le cytosquelette d'actine et ses protéines associées, détectent, subissent, transmettent et génèrent des forces mécaniques tant internes qu'externes, les plaçant de ce fait comme des acteurs centraux de la mécanotransduction.

Les tensions mécaniques induisent un étirement des protéines assurant une fonction signalétique mais peuvent également aboutir à la dénaturation de la structure de celles-ci et donc à la perte de leur fonction biologique (cf. section 1.2.1). En l'occurrence, les systèmes de contrôle de qualité des protéines, dont nous explorerons les fonctions majeures et décrirons quelques-uns de ces acteurs (section 1.2), prennent en charge par exemple les protéines endommagées. Ainsi, de nombreuses études ont mis en relation l'importance du CQP dans le maintien de l'intégrité et de la modulation du cytosquelette d'actine. Cette notion sera abordée dans le paragraphe 1.2. Tout d'abord nous introduirons le cytosquelette d'actine et les protéines impliquées dans son architecture et sa dynamique.

L'actine, qui est la protéine la plus abondante, la plus conservée et la plus ubiquitaire des protéines eucaryotes, se polymérise pour former des filaments d'actine (F-actine) qui sont eux-mêmes assemblés au sein de structures plus complexes possédant chacune une spécificité de fonction (Pollard 2016). Par conséquent, l'architecture et la dynamique du cytosquelette d'actine sont gouvernées par diverses protéines liant l'actine (« *Actin Binding Proteins* » ou ABP) et des protéines régulatrices qui possèdent un rôle critique dans les fonctions cellulaires (Pollard 2016; Svitkina 2018). En effet, le cytosquelette d'actine fournit un support physique permettant à la cellule d'assurer une fonction distincte. Des perturbations de ce réseau structurel provoquent alors une rupture des propriétés mécaniques et/ou de la forme des cellules, ce qui interfère avec différentes fonctions cellulaires. D'ailleurs, des mutations des composants ou des régulateurs du cytosquelette d'actine sont associées à de nombreuses pathologies humaines puisque l'altération de l'organisation et/ou de la dynamique des filaments d'actine modifie la forme des cellules, la croissance et la réponse à de nombreux stimuli (Khaitlina, 2001). Ceci perturbe alors des fonctions cellulaires fondamentales conduisant par exemple au processus métastatique ou à des dysfonctionnements des structures contractiles cellulaires associés à des myopathies ou cardiomyopathies de sévérité diverse (Lodish et al., 2008).

1.1.1. Régulation du cytosquelette d'actine par les protéines se liant à l'actine (ABP).

Le remodelage dynamique de l'architecture du cytosquelette d'actine est géré par les ABP qui régulent la polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine, leur fragmentation, leur réticulation en faisceaux (ou câbles) et réseaux ou encore de leur association avec d'autres structures cellulaires (telle que la membrane plasmique)(Pollard 2016; Svitkina 2018). De nombreuses ABP ont été caractérisées et peuvent se lier aux monomères et/ou aux filaments dans le but, entre autres, d'initier l'assemblage de nouveaux filaments, d'induire une elongation d'un filament existant, de lier les extrémités des filaments pour les stabiliser ou stopper leur polymérisation (Pollard 2016; Svitkina 2018). L'ensemble de ces processus permet donc un renouvellement constant et contrôlé des structures cellulaires à base d'actine, en réponse au besoin cellulaire.

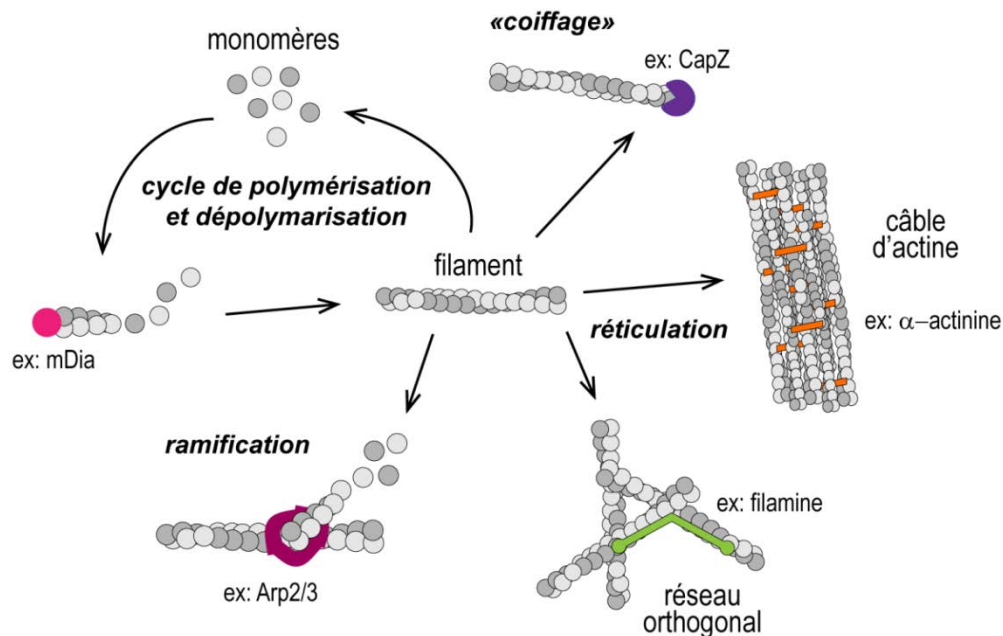


Figure 1.1: Régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine et de son organisation par les ABP (Pollard 2016).

Les facteurs de nucléation, tels que mDia de la famille des formines, induisent la polymérisation des filaments de novo à partir des monomères d'actine. En outre, mDia est essentielle pour la formation du cortex d'actine mitotique (Rosa et al, 2015). Les extrémités des filaments d'actine peuvent être stabilisées par des protéines de « coiffe », comme CapZ qui est constituée de deux sous-unités α et β , qui préviennent la polymérisation ou la dépolymérisation (Rottner et al. 2017). De base, un nouveau filament s'allonge rapidement avant que ses extrémités ne soient « coiffées ». Ainsi, ce processus permet à la cellule de maintenir un contrôle spatio-temporel fin de la distribution de la F-

actine et donc, de la longueur des filaments (Ono 2010). Il a été récemment montré par exemple que CapZ, via la régulation de la longueur des filaments d'actine, participerait à la modulation de l'architecture du cortex d'actomyosine mitotique dont une régulation très fine est requise pour assurer la division adéquate des cellules (détaillé paragraphe 1.4.2.1.1 ; Chugh et al. 2017). Les filaments peuvent être ramifiés, grâce à l'action du complexe Arp2/3 (« *Actin related proteins 2 and 3* »), constitué de sept sous-unités, qui initie la nucléation d'un nouveau filament à partir d'un filament préexistant (Mullins, Heuser, et Pollard 1998; Amann et Pollard 2001). Ceci favorise par exemple la formation du lamellipode, qui est un réseau ramifié dense de filaments situé au front de migration des cellules qui fournit la force mécanique requise pour « pousser » la membrane vers l'avant dans des cellules en migration (Svitkina et Borisy 1999; Shao et al. 2006; Goley et Welch 2006; Isogai et al. 2015). Par ailleurs, d'autres ABP agissent sur la fragmentation des filaments, leur dépolymérisation, assurant ainsi le renouvellement du « pool » de monomères d'actine, ou encore la séquestration des monomères, mais ne seront pas décrites ici.

Les protéines de réticulation ancrent les filaments les uns aux autres pour créer un réseau d'actine et former des structures plus complexes (Pollard 2016; Svitkina 2018). Celles-ci peuvent être monomériques avec deux sites de liaisons à F-actine ou dimériques, où chacune des sous-unités possède un site d'association. On distingue les réseaux parallèles, qui permettent la formation des câbles d'actine, et orthogonaux (fig. 1.1). Les dimères de filamine, dont les deux sites de liaison à l'actine sont éloignés l'un de l'autre, favorisent par exemple la formation du réseau orthogonal qui forme le cortex cellulaire au front de migration des cellules (Pollard 2016; Svitkina 2018). Par ailleurs, les dimères d' α -actinine forment des câbles où l'espacement entre les filaments d'actine permet à myosine II, principal moteur de la contraction du réseau d'actine, d'interagir avec la F-actine au sein des câbles (Pollard 2016; Svitkina 2018).

Des centaines d'ABP sont connues à ce jour, ainsi, nous avons choisi de présenter dans la section suivante des ABP qui présentent un intérêt particulier pour les travaux relatifs à cette thèse.

1.1.2. Formation et régulation des réseaux d'actomyosine.

La génération des forces contractiles, qui est produite par la contraction du réseau d'actine par myosine II, est à la base de la morphogenèse des cellules et des tissus (Koenderink et Paluch 2018; Agarwal et Zaidel-Bar 2018). Il est à noter qu'il existe de nombreuses myosines dans les cellules, mais nous nous intéresserons ici uniquement à myosine II qui gouverne la contractilité des réseaux d'actine et la tension cellulaire dans les cellules musculaires et non musculaires. Les cellules

animales utilisent les forces contractiles dans une grande variété de processus allant du niveau subcellulaire (ex. : l'endocytose), cellulaire (ex. : la migration, la division pour la formation du cortex rigide et la formation de l'anneau contractile en cytokinèse) et tissulaire (ex.: formation de tissus dans les embryons en développement, muscle) (Agarwal et Zaidel-Bar 2018).

La régulation de la contractilité résulte de l'activation spatio-temporelle de la signalisation des petites GTPases de la famille Rho (« *Ras homologous* »), en aval des récepteurs membranaires (fig. 1.2; Agarwal et Zaidel-Bar 2018). Cette activation spatio-temporelle est dictée par la localisation distincte des RhoGEF et des RhoGAP (protéines activatrices et inactivatrices des Rho GTPases, respectivement, fig. 1.2) et limite la signalisation des protéines Rho dans une région spécifique de la cellule. Ce mécanisme est crucial par exemple pour la synaptogenèse (Tolias, Duman, et Um 2011; Duman et al. 2015).

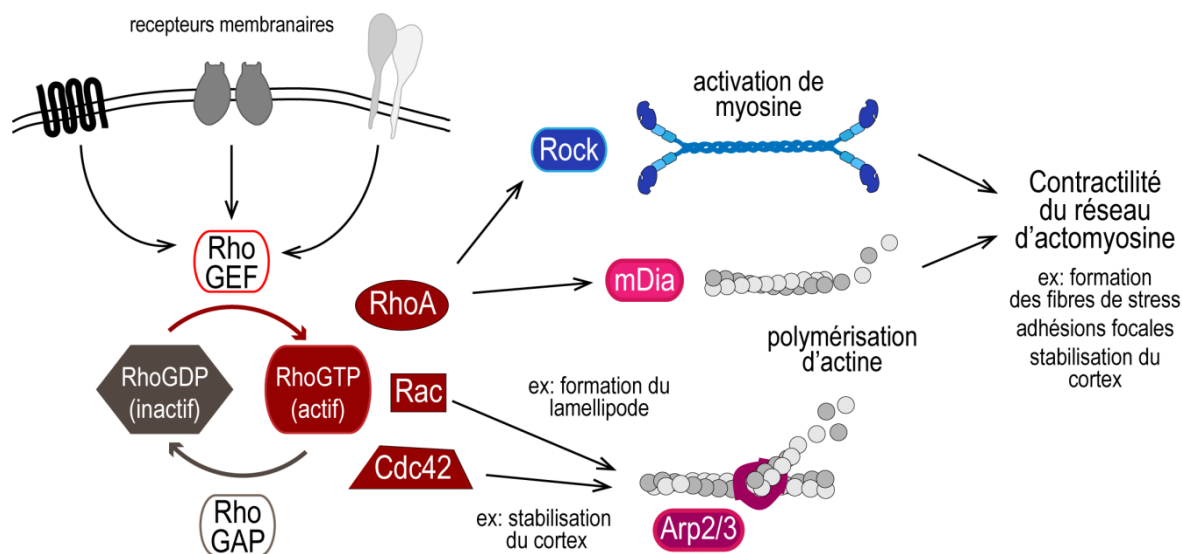


Figure 1.2: Régulation spatio-temporelle de la contractilité par la signalisation des Rho GTPases (Murali et Rajalingam 2014). En tant que commutateurs moléculaires, les Rho GTPases alternent entre une forme «active» liée au GTP et une forme «inactive» liée au GDP pour exécuter leur fonction en réponse aux stimuli extracellulaires. L'activation des Rho GTPases est catalysée par les RhoGEF (facteur d'échange de nucléotides guanilyques), qui échangent GDP avec GTP, et leur inactivation est catalysée par des RhoGAP (protéines activant la GTPase). Dans sa forme active, RhoGTP se lie à ses effecteurs, les formines comme mDia et à la Rho kinase (ROCK), qui polymérisent l'actine et phosphorylent et activent la myosine-II, conduisant respectivement à la formation de structures d'actomyosine. L'activation de Rac1 ou Cdc42 stimule la polymérisation d'actine via l'activation du complexe Arp2/3 pour faciliter la formation des lamellipodes ou stabiliser le cortex par exemple.

Les Rho GTPases appartiennent à la superfamille Ras (plus d'une centaine de protéines), subdivisée en neuf familles — Ras, Rho, Rab, Rap, Arf, Ran, Rheb, Rad et Rit — elles-mêmes subdivisées en sous-familles (Wennerberg, Rossman, et Der 2005). Par exemple, la famille Ras est généralement

responsable de la prolifération cellulaire, Ran du transport nucléaire et Rho de la morphologie cellulaire. Ces dernières sont des régulateurs centraux de la réorganisation de l'actine favorisant diverses fonctions cellulaires nécessitant la régulation de la contractilité du réseau d'actomyosine, telles que la migration, l'adhésion ou la division cellulaire (fig. 1.2; Murali et Rajalingam 2014). En effet, elles stimulent la polymérisation des filaments d'actine via les formines, comme mDia, ou Arp2/3 (fig. 1.2). En parallèle, elles permettent l'activation de la chaîne légère de myosine (MLC) via sa phosphorylation, en activant par exemple la kinase ROCK (fig.1.2; Amano et al. 1996).

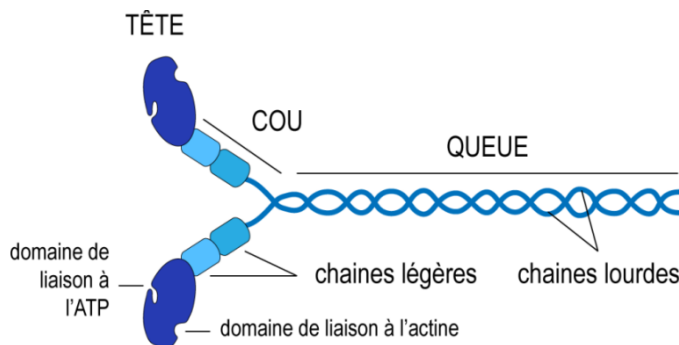


Figure 1.3: Structure d'un dimère de myosine II (Vicente-Manzanares et al. 2009).

Au niveau moléculaire, myosine II est constituée de deux chaînes lourdes qui dimérisent, associées à deux chaînes légères régulatrices de l'activité ATPase (fig. 1.3). Les chaînes lourdes contiennent trois domaines distincts : le domaine de la tête globulaire qui contient des sites de liaison à l'actine et à l'ATP et est responsable de la génération de forces; la région du col est associée aux chaînes légères régulatrices qui contribuent à la stabilité de la protéine et à la régulation de son activité ; et le domaine de la queue consiste en une hélice super-enroulée requise pour la dimérisation de la myosine II (Vicente-Manzanares et al. 2009). L'association des dimères de myosine II aux filaments d'actine est contrôlée par les têtes globulaires qui contiennent le domaine de liaison à l'actine et à l'ATP. Un cycle d'hydrolyse de l'ATP par les têtes du dimère engendre un mouvement de celles-ci et fait alors « glisser » les filaments d'actine les uns sur les autres entraînant la contraction du réseau d'actomyosine (Kiani et Fischer 2016).

De manière importante, la phosphorylation des chaînes légères régulatrices de myosine II stimule son activité enzymatique, essentielle pour les cycles d'association/dissociation aux filaments d'actine, mais favorise également son assemblage en des filaments d'ordre supérieur (Matsumura 2005). Les dimères de myosine II assemblés dans des filaments bipolaires de tailles variables (d'une dizaine à plus de 300 molécules) vont alors contribuer à l'organisation et à la contraction de structures à base d'actine (Dasbiswas et al. 2018). Il est à noter qu'une protéine du contrôle de

qualité des protéines, la protéine chaperon UNC-45 (« *UNCcoordinated mutant number 45* »), est requise pour l'assemblage de ces filaments ainsi que leur recrutement aux structures contractiles (Lehtimäki et al. 2017). Ceci montre une implication directe du CQP au cœur du maintien de l'intégrité des structures contractiles d'actomyosine (discuté section 1.2.2).

1.1.3. Les structures complexes d'actine, les forces contractiles et la mécanotransduction : aux commandes des processus cellulaires dépendants de la dynamique du cytosquelette.

L'organisation architecturale du réseau d'actomyosine diffère selon la structure d'actomyosine dont il est question et diffère donc selon le type cellulaire (non musculaire ou musculaire, et est même différent entre muscles striés et lisses) (Dasbiswas et al. 2018; Koenderink et Paluch 2018). Plusieurs ABP, comme **α -actinine**, **filamine** et **CapZ**, sont impliquées à la fois dans l'organisation des structures d'actomyosine des cellules musculaires (sarcomère, disque Z, costamère [centre de signalisation remplissant une fonction analogue aux FA et partageant une composition protéique similaire, dont les intégrines (Peter et al. 2011; Jaka et al. 2015; Henderson et al. 2017)]) et pour l'architecture des structures non musculaires (cortex, adhésions focales, fibres de stress) (fig. 1.4).

Brièvement, dans les cellules musculaires, **α -actinine** assure l'ancrage des filaments d'actine et constitue le squelette du **disque Z**, un complexe multi-protéiques qui délimitent les extrémités des sarcomères (unités contractiles fonctionnelles de la cellule musculaire) (fig. 1.4; Henderson et al. 2017). Au sein du disque Z, **CapZ**, elle, se lie à α -actinine et y coiffe les filaments d'actine pour assurer leur stabilisation (fig. 1.4; Papa et al. 1999). Cette structure joue donc un rôle central dans l'assemblage, l'organisation et la fonction des sarcomères, tout comme dans leur intégrité (Knoll et al. 2002).

Filamine sert de lien entre le **disque Z** et les **intégrines** des **costamères** ancrant ainsi le cytosquelette à la MEC (fig. 1.4; Knöll, Buyandelger, et Lab 2011; Henderson et al. 2017). De manière importante, **filamine** remplit la même fonction dans les **FA** des cellules non musculaires. Il est à noter que la complexité de l'adhésome ne cesse de croître, avec déjà plus de 200 protéines différentes identifiées dont des protéines adaptatrices du cytosquelette, des protéines kinases et phosphatases, des protéines de signalisation et de nombreuses ABP, dont vinculine, taline, **filamine A**, **α -actinine**, **CapZ β** , cortactine, etc...(Geiger et Zaidel-Bar 2012).

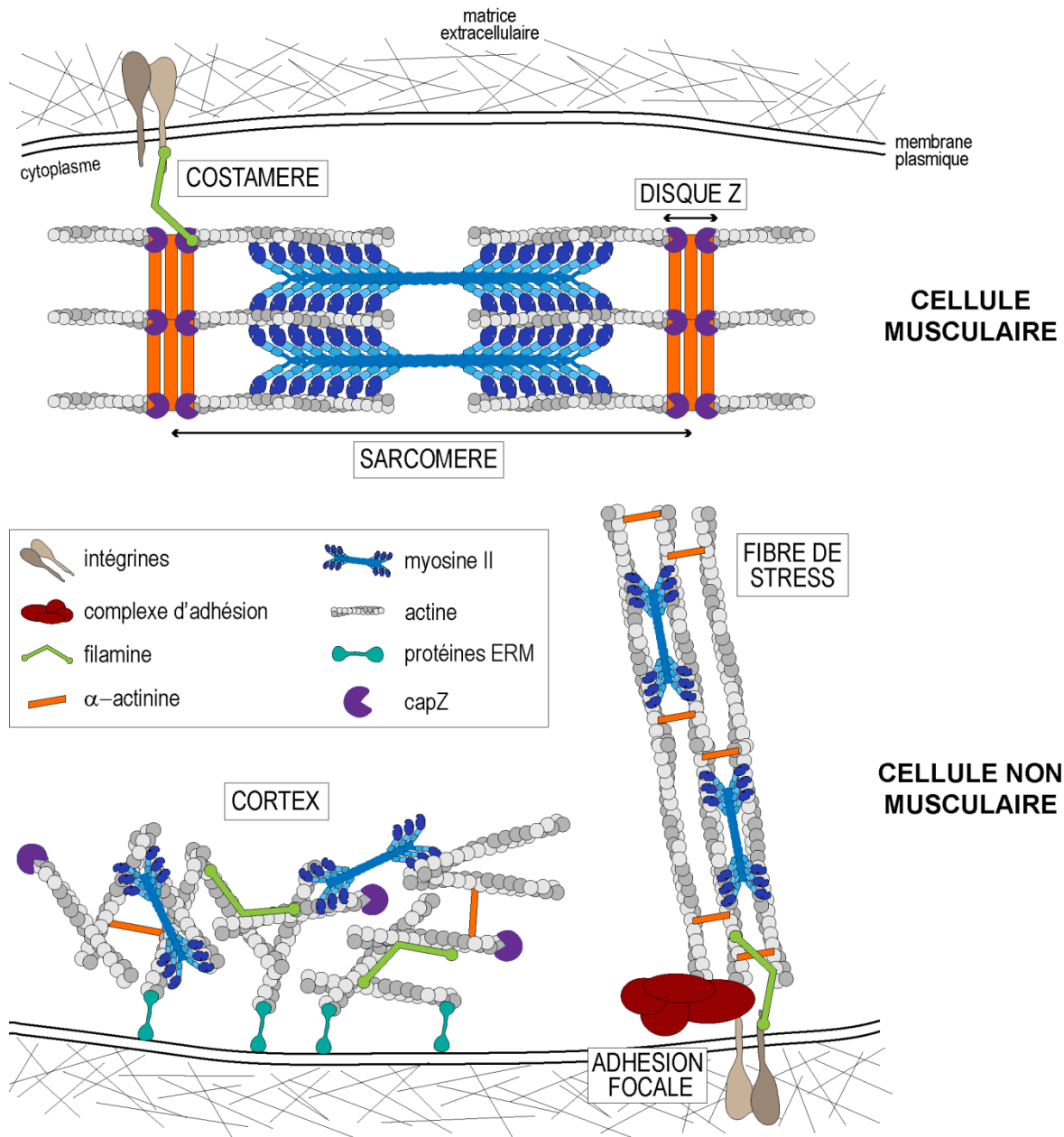


Figure 1.4: Organisation des structures d'actomyosine dans le sarcomère, les fibres de stress et le cortex (Rahimov et Kunkel 2013; Schiffhauer et Robinson 2017; Rottner et al. 2017). L'architecture des structures complexes d'actomyosine dans les cellules musculaires ou non musculaires est orchestrée par les mêmes ABP telles que α -actinine, filamine ou encore capZ.

L'architecture du réseau d'actomyosine est généralement moins ordonnée dans les cellules non musculaires (Koenderink et Paluch 2018). Cependant, un fort parallèle a été établi entre le modèle de structure et de contraction des **fibres de stress**, qui sont les câbles d'actomyosine contractiles dans les cellules non musculaires, avec l'organisation des sarcomères musculaires (fig. 1.4). Les fibres de stress sont en effet composés de filaments d'actine majoritairement réticulés par α -

actinine, mais d'autres protéines ont été détectées dans ces structures telle que **filamine** (Pellegrin et Mellor 2007). En outre, la localisation d' α -actinine est périodique le long de la fibre et les filaments d'actine sont maintenus parallèlement dans les câbles par α -actinine, de manière analogue à son rôle au niveau du disque Z des sarcomères (Pellegrin et Mellor 2007).

Pour finir, juste en dessous de la membrane plasmique, les filaments du **cortex d'actine** forment un réseau essentiellement isotrope (de 20 à 250 nm d'épaisseur) avec des filaments orientés parallèlement et perpendiculairement à la membrane (fig. 1.4; Salbreux, Charras, et Paluch 2012). Les filaments d'actine corticaux sont organisés en un réseau dense réticulé qui contient myosine II non musculaire ainsi que plus de 150 ABP différentes, incluant **α -actinine**, **filamine** et **CapZ** (fig. 1.5; Biro et al. 2013; Chugh et Paluch 2018). La F-actine corticale est attachée à la membrane plasmique notamment par des protéines de la famille ezrine-radixine-moésine (ERM) grâce à leur capacité à interagir avec les protéines transmembranaires et le cytosquelette (Fehon, McClatchey, et Bretscher 2010; Biro et al. 2013). Étant connecté à la membrane cellulaire, le réseau d'actine corticale contrôle les changements de forme des cellules animales par le contrôle et la modulation locale de la tension corticale. Par exemple, α -actinine, myosine et filamine, présentent des propriétés physiques et une cinétique de liaison et de dissociation distinctes à la F-actine et répondent dynamiquement aux signaux chimiques et mécaniques pour effectuer ces changements de forme. Ces changements dynamiques sont cruciaux pour des processus tels que la division, la migration, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, ex : pendant la morphogenèse) ou encore la différenciation cellulaire (Chalut et Paluch 2016).

De manière importante, les ABP **α -actinine**, **filamine** et **CapZ**, ont été rapportées comme des protéines structurales opérant une fonction de senseur mécanique. Par exemple, les tensions mécaniques appliquées sur filamine ont pour conséquence une modification de sa structure qui permet de découvrir des sites de liaison à d'autres partenaires protéiques (Ehrlicher et al. 2011). Ce processus participe donc de manière directe à la mécanotransduction cellulaire.

Il est à noter que les forces contractiles sont à la base de la mécano-sensibilité. Le niveau de connectivité des filaments d'actine ainsi que leurs longueurs sont dépendants des ABP et influencent la contractilité des structures d'actine (Svitkina 2018; Koenderink et Paluch 2018). Ainsi, le remodelage du réseau d'actine grâce aux ABP, l'activité de myosine II en générant les forces contractiles, ainsi que les molécules d'adhésion, jouent un rôle crucial dans la mécano-sensation cellulaire (Ciobanasu, Faivre, et Le Clainche 2013). L'équilibre entre contrainte

contractile et force d'adhésion agit en tant que modulateur de la tension cellulaire et de la conversion des signaux mécaniques (tension) en signaux biochimiques (maturation des FA par exemple), régulant ainsi la communication entre la cellule et la MEC (Tojkander, Gateva, et Lappalainen 2012). Ces mécanismes s'appliquent tant dans les cellules musculaires, dictés par la communication disques Z/costamères, que dans les cellules non musculaires à travers la communication fibres de stress/FA.

Les disques Z, via leurs réseaux de protéines associées, constituent une structure mécanotransductrice essentielle puisqu'ils détectent, intègrent et propagent les tensions biomécaniques (Knöll et al. 2002). Ils assurent alors une fonction centrale pour la génération et la transmission des forces de contraction dans les cellules musculaires (Knöll, Buyandelger, et Lab 2011). Par ailleurs, les costamères sont aussi capitaux pour assurer la mécanotransduction dans les cellules musculaires en transmettant les forces générées par le sarcomère à la MEC et, inversement, de la MEC aux myocytes. Puisque filamine établit le lien entre les intégrines des costamères et le disque Z, celle-ci est donc impliquée dans la transduction des signaux émanant des intégrines (Knöll, Buyandelger, et Lab 2011; Henderson et al. 2017). Filamine joue de ce fait un rôle important dans le maintien de la stabilité cellulaire pendant la contraction musculaire (Henderson et al 2017).

Par ailleurs, les fibres de stress ventrales sont reliées aux FA aux deux extrémités et représentent le principal mécanisme contractile dans de nombreuses cellules en interphase (Tojkander, Gateva, et Lappalainen 2012). L'assemblage des fibres de stress est initié lorsque la cellule est sous contrainte mécanique. Celles-ci jouent donc un rôle important dans les réponses mécaniques et génèrent des forces, qui par exemple via des cycles de contractions occasionnelles, favorisent la constriction arrière de la cellule et initie la motilité cellulaire (Mitchison et Cramer 1996; Letort et al. 2015).

En outre, l'assemblage, la croissance et le maintien des FA dépendent des contraintes mécaniques. D'ailleurs, l'inhibition de la contractilité induite par myosine II entraîne une diminution de leur taille, tandis que l'application d'une force mécanique augmente leur taille de manière indépendante de myosine (Tojkander, Gateva, et Lappalainen 2012). Ainsi, en réponse aux tensions mécaniques, soit extracellulaires soit intracellulaires, générées par les fibres de stress, la composition et la signalisation des FA sont soumises à des changements entraînant une augmentation de l'ancrage ou un désassemblage contrôlé des adhésions à la matrice. Il est à noter que la composition de l'adhésome est sensible à l'activité contractile d'actomyosine (Kuo et al. 2011; Schiller et Fässler

2013) et que les tensions mécaniques peuvent modifier la conformation et l'activité des protéines mécano-sensibles constituant les FA, comme filamine (Rognoni et al. 2012), α -actinine, myosine ou les intégrines elles-mêmes (Friedland, Lee, et Boettiger 2009). Par exemple, α -actinine et filamine s'accumulent en réponse aux contraintes mécaniques permettant aux cellules de détecter et de répondre à ces signaux (Schiffhauer et al. 2016). Ainsi, les FA constituent une plateforme mécano-sensorielle importante et les fibres de stress jouent un rôle important dans la maturation et la dynamique de ces dernières (Tojkander, Gateva, et Lappalainen 2012).

Mécaniquement, le réseau cortical d'actomyosine constitue le principal déterminant de la tension de la surface cellulaire. En outre, la génération de forces peut induire une augmentation de cette tension corticale (Walcott et Sun 2010). Le cortex joue alors un rôle comparable à celui de la paroi cellulaire des bactéries ou des cellules végétales : il confère une résistance aux contraintes mécaniques externes et s'opposerait à la pression osmotique intracellulaire (Salbreux, Charras, et Paluch 2012). Ces deux propriétés ont en outre une fonction essentielle au moment de la division cellulaire et seront discutées paragraphe 1.4.2 (Stewart et al. 2011; Sorce et al. 2015). Par ailleurs, la rigidité corticale joue aussi un rôle important dans la résistance aux contraintes mécaniques. Il a été montré que α -actinine et filamine coopèrent pour favoriser la rigidité des réseaux de filaments d'actine (Esue, Tseng, et Wirtz 2009). Des travaux récents ont permis de mieux comprendre l'organisation et la régulation du cortex. L'assemblage du réseau de F-actine cortical semble résulter de l'action combinée des formines, comme mDia, et du complexe Arp2/3 (Bovellan et al. 2014; Chugh et Paluch 2018). Il a aussi été montré par exemple, que les protéines qui affectent l'épaisseur du cortex d'actine, comme la protéine CapZ, affectent la tension corticale, même si l'activité de myosine semble inchangée (Chugh et al. 2017). Donc la modification des paramètres structuraux de l'architecture du réseau d'actine, telle que la longueur du filament d'actine, influencerait la rigidité et semble moduler la tension d'actomyosine (Chugh et al. 2017). Malgré cela, la manière dont le réseau est réorganisé en réponse à la signalisation cellulaire, et le rôle que la réorganisation peut jouer lors des changements d'état des cellules, sont encore peu compris et restent à déterminer.

L'importance de la capacité d'une cellule à détecter et à réagir aux forces mécaniques n'est plus à démontrer. Néanmoins, les mécanismes moléculaires par lesquels les signaux physiques sont convertis en informations chimiques « instructives » afin d'influencer le comportement des cellules ne sont toujours pas élucidés. Il apparaît que les ABP et protéines associées à F-actine semblent absolument centrales dans ce processus. Notamment, une telle fonction de ces protéines mécano-sensibles serait, entre autres, associée à un changement de conformation engendrés par les tensions

mécaniques. Dans des cas où les contraintes mécaniques semblent plus aiguës ou chroniques, comme lors de la contraction musculaire, une dégradation de filamine a été observée (Arndt et al. 2010), suggérant une dénaturation de sa structure. Ainsi, quelques évidences indiquent un lien entre le contrôle de qualité des protéines (CQP) et la mécanotransduction. De plus, il est clairement établi que le CQP est essentiel au maintien de l'architecture et de l'intégrité du cytosquelette d'actine, et particulièrement lorsque ce dernier subit des forces mécaniques telles qu'observées dans les muscles. Le complexe d'intérêt de cette étude, BAG3-HSPB8, semble assurer l'intégrité des cellules musculaires et le muscle dans son intégralité, entre autres, via le contrôle de qualité de filamine (cf. paragraphe 1.3.4.1). De plus, ce dernier a été impliqué dans d'autres processus nécessitant une haute dynamique et/ou maintien du cytosquelette d'actine, comme la migration cellulaire (section 1.3.4). Dans les prochaines sections seront présentées les fonctions et les modes d'action d'acteurs du CQP, entre autres les chaperons moléculaires et les systèmes de dégradation des protéines. Une attention particulière sera portée aux liens avec le contrôle de qualité des structures cellulaires à base d'actine.

1.2. Le contrôle de qualité des protéines et l'intégrité des structures à base d'actine.

Fondamentalement, le maintien d'un protéome fonctionnel est absolument indispensable pour tous les organismes puisque l'exécution des processus cellulaires dépend de l'intégrité des protéines, ainsi que de la bonne coordination de leurs interactions. Les organismes vivants maintiennent leur protéome dans un équilibre dynamique en balançant l'expression des gènes, la traduction et la dégradation des protéines (Hartl 2016). Les changements coordonnés de ces processus permettent à l'organisme de s'adapter aux facteurs abiotiques et aux signaux physiologiques. Parallèlement, le protéome est menacé par des mutations, des erreurs de transcription et de traduction, ainsi qu'un stress protéotoxique (Balchin, Hayer-Hartl, et Hartl 2016; Sala, Bott, et Morimoto 2017).

Les cellules eucaryotes ont donc développé un vaste réseau de signalisation constitutif et inductible par le stress pour assurer l'homéostasie du protéome (= protéostasie). Ce réseau signalétique complexe, nommé réseau de la protéostasie, assure donc le contrôle de qualité des protéines cellulaires et est constitué de systèmes interconnectés de « surveillance » du protéome, depuis la biogenèse d'une protéine à sa dégradation. Ces systèmes prennent donc en charge (a) le repliement des protéines nouvellement synthétisées pour leur permettre d'acquérir leur conformation tridimensionnelle unique (ou structure native) qui va leur conférer leur fonction biologique, (b) la renaturation des protéines endommagées, (c) l'assemblage et le désassemblage spatio-temporels de

complexes multi-protéiques, (d) le contrôle de la séquestration protectrice et/ou la dégradation de protéines et d'organelles, endommagées ou superflues.

1.2.1. Les acteurs du contrôle de qualité des protéines.

1.2.1.1. Généralités sur le contrôle de qualité des protéines et pathologies associées.

Les cellules expriment des chaperons moléculaires, un groupe large et diversifié de protéines qui partagent la propriété d'assister le repliement et l'assemblage/désassemblage d'une protéine ou d'un complexe protéique, sans faire partie intégrante de sa structure finale (Kim et al. 2013; Ellis 2013). Par exemple, les chaperons sont essentiels pour assister l'assemblage de larges complexes multi-protéiques qui possèdent des fonctions fondamentales dans les cellules comme les nucléosomes ou le protéasome (Ellis 2006), une des machineries majeures de dégradation protéique cellulaires. Globalement, les chaperons moléculaires sont impliqués dans tous les aspects de la protéostasie, de sa synthèse à sa dégradation (fig. 1.5).

Les protéines de choc thermique HSP (« *Heat Shock Protein* ») constituent une famille majeure de chaperons moléculaires. Initialement, les HSP ont été découvertes chez *Drosophila melanogaster* suite à un choc thermique, où une expression massive de certains gènes a été observée : les produits de ces gènes, ont ainsi été nommés « protéines de choc thermique » (Ritossa 1962; Tissières et al. 1974). Bien que leurs fonctions aient été découvertes en conditions de stress et malgré ce que leur nom indique, les HSP ne sont pas nécessairement des protéines de réponse au stress. Ces protéines sont exprimées constitutivement et ubiquitairement dans l'organisme et assurent des fonctions physiologiques variées comme la sécrétion et le recyclage des vésicules, le transport des protéines, leur translocation à travers la membrane et l'assemblage et/ou le désassemblage des complexes protéiques (Young, Barral, et Ulrich Hartl 2003; Clerico et al. 2015; Lehtimäki et al. 2017; Sala, Bott, et Morimoto 2017). Ces fonctions sont assurées par leur capacité à favoriser le repliement des protéines *de novo* suite à leur synthèse, puis assurent leur contrôle de qualité en assistant leur repliement en cas de dénaturation, leur séquestration et/ou leur dégradation si nécessaire (fig. 1.5; Ellis 2013; Kim et al. 2013).

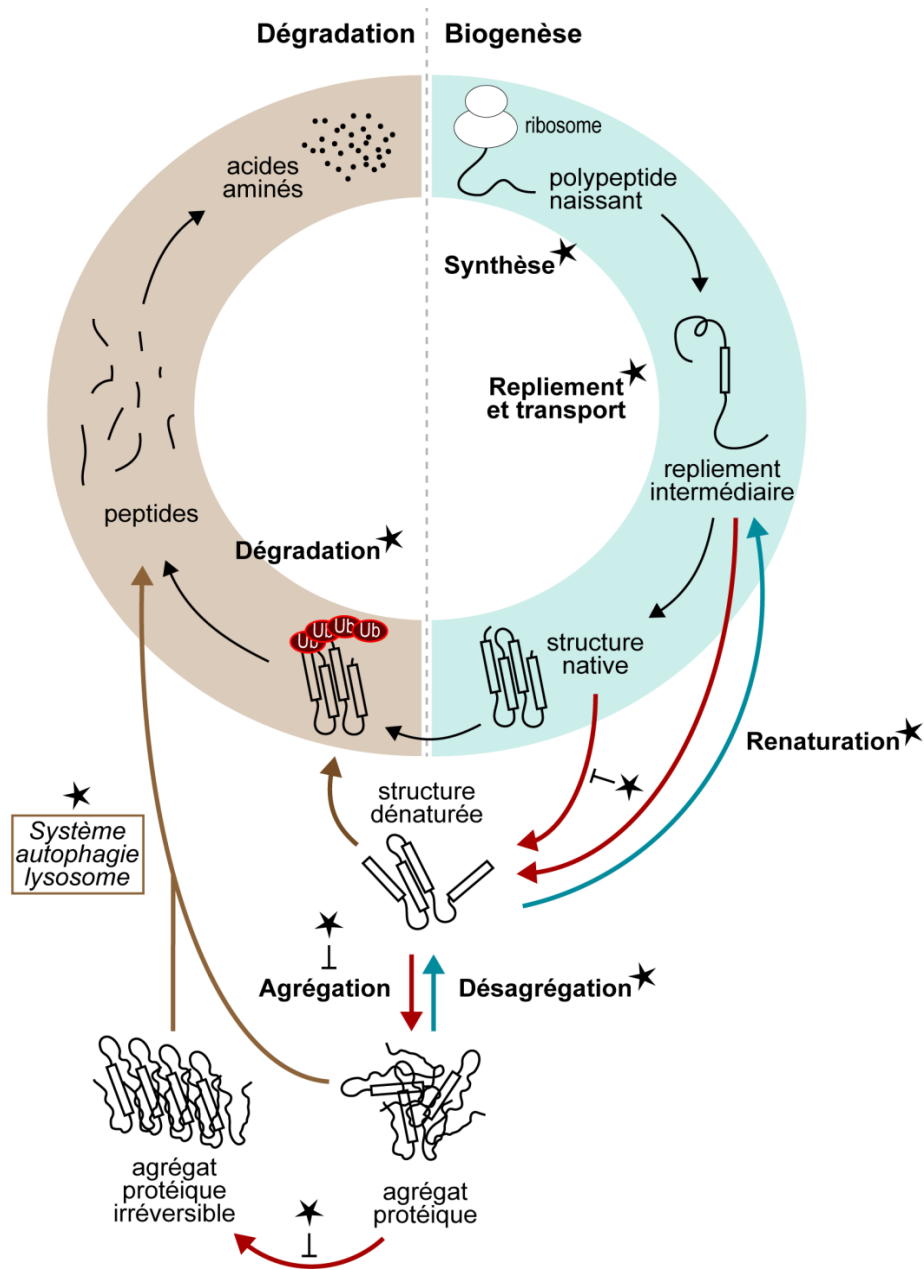


Figure 1.5: Le réseau de la protéostasie assisté par les chaperons moléculaires (Kim et al. 2013; Sala, Bott, et Morimoto 2017). Le flux de la protéostasie (flèches noires) englobe les processus cellulaires qui guident la synthèse de la chaîne polypeptidique naissante, le repliement (co-traductionnel et post-traductionnel), le transport (cytoplasme, membranes, compartiments subcellulaires [réticulum endoplasmique, mitochondrie, noyau]) et la dégradation de toutes les protéines. Parmi les composants du réseau de la protéostasie, les chaperons moléculaires agissent à chacune de ces étapes (étoiles noires). L'activité des chaperons est régulée par des associations spécifiques avec les co-chaperons et d'autres partenaires qui déterminent la spécificité du substrat et la fonction des complexes de chaperons. Dans des conditions physiologiques, le repliement erroné d'une protéine est dû à des mutations génétiques, à une transcription/traduction incorrecte ou à une biogenèse inefficace. Cependant, le stress environnemental ou intracellulaire et les changements dus au vieillissement augmentent fortement la quantité de protéines mal repliées. Les conformations non natives (flèches rouges) sont reconnues par les chaperons pour empêcher l'accumulation de protéines anormales dans la cellule. A ce stade, les chaperons peuvent fonctionner comme

(a) des « holdases » indépendantes de l'ATP qui interagissent avec des polypeptides non natifs pour empêcher leur agrégation, (b) des « foldases » qui favorisent activement le repliement des protéines, (c) des « désagrégases » qui extraient des polypeptides d'agrégats de manière dépendante de l'ATP et (d) des systèmes de séquestration pour prendre en charge les agrégats protéiques irréversibles (flèches bleues). Si ces systèmes échouent, les protéines dénaturées et/ou agrégées sont dirigées vers les voies de dégradation (flèches brunes).

On distingue deux classes de chaperons moléculaires essentiels : les chaperons à activité dépendante ou indépendante de l'ATP. Cette seconde classe de protéines est représentée par la famille des petites protéines de choc thermique ou HSPB (« *Heat Shock Protein family B* ») qui sont des chaperons moléculaires dont les fonctions indépendantes de l'ATP seront détaillées section 1.2.1.2. Les chaperons moléculaires à domaine ATPase vont stimuler le repliement des protéines dénaturées grâce à des cycles d'hydrolyse de l'ATP ou les diriger vers les voies de dégradation. Il s'agit des chaperons HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ou encore HSP100, classés au sein des différents groupes sur la base de leur homologie de séquences, et ils ont été initialement nommés selon leur poids moléculaires (Bar-Lavan, Shemesh, et Ben-Zvi 2016). En outre, ces chaperons sont assistés par des co-chaperons moléculaires qui jouent un rôle crucial dans la régulation et la spécification des fonctions des chaperons. La plupart des co-chaperons possèdent plusieurs fonctions régulatrices, comme coupler la reconnaissance du substrat et moduler l'activité ATPase du chaperon (Bar-Lavan, Shemesh, et Ben-Zvi 2016). Les co-chaperons participent ainsi au triage des activités des chaperons moléculaires, et par conséquent, au devenir des substrats comme leur repliement ou leur dégradation.

Les mécanismes de dégradation ciblée des protéines font partie intégrante du CQP et l'existence d'une régulation fine de la durée de vie des protéines et de leur fonction, au niveau spatio-temporel, est essentielle dans une cellule (Hershko et Ciechanover 1998). Par exemple, comme mentionné précédemment, une dégradation rapide de certaines protéines est requise pour la progression des cellules en division (Clute et Pines 1999; Sivakumar et Gorbsky 2015). Cette notion sera abordée en détail dans le paragraphe 1.4.1 et 1.4.3. Deux systèmes majeurs de dégradation protéique, le système ubiquitine-protéasome et le système autophagie-lysosome, se coordonnent dans les cellules pour assurer le renouvellement normal des protéines et prendre en charge les protéines endommagées pour limiter leur accumulation dans des conditions de stress (fig. 1.6). Une multitude de facteurs induisent une dénaturation protéique incluant des stress cellulaires endogènes et exogènes (élévation de la température, stress oxydant), ainsi que des processus cellulaires physiologiques, par exemple, comme mentionné préalablement, les forces mécaniques engendrées lors de la migration ou de la contraction des structures d'actomyosine (Sala, Bott, et Morimoto

2017). Outre l'importance primordiale de maintenir la conformation native pour conserver la fonction intrinsèque d'une protéine, les protéines non-conformées ou dénaturées sont enclines à promouvoir des interactions non spécifiques avec d'autres composants cellulaires via l'exposition de résidus hydrophobes (Meredith 2005; Olzscha et al. 2011; Vabulas et Hartl 2011). Ceci interfère d'une part avec leur fonction, et peut d'autre part conduire à une agrégation irréversible de ces protéines au sein d'inclusions qui peut être toxique pour la cellule. Ainsi, les HSP vont prendre en charge ces protéines pour éviter et/ou contrôler leur agrégation, que ce soit en favorisant leur renaturation, en les séquestrant de manière réversible ou en les ciblant aux systèmes de dégradation (fig. 1.5).

L'apparition d'un large spectre de pathologies associées à des altérations de l'activité ou de la régulation des acteurs du CQP démontre que le maintien de la protéostasie est critique pour la survie cellulaire et la santé de l'organisme. En l'occurrence, des pathologies dites de repliement ou « conformationnelles », incluant des maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson ou d'Huntington), sont caractérisées par une accumulation et une agrégation de protéines dénaturées (Labbadia et Morimoto 2015; Hartl 2017; Sontag, Samant, et Frydman 2017; Dubnikov, Ben-Gedalya, et Cohen 2017; Chiti et Dobson 2017). À l'inverse, les cellules cancéreuses tirent profit de ces systèmes de CQP cellulaires. La surexpression et les mutations des oncogènes, la polyploïdie, l'instabilité génétique et les niveaux de traduction élevés génèrent une demande exacerbée de « mobilisation » des chaperons en charge du repliement des protéines (Calderwood et Murshid 2017). Par exemple, les divisions cellulaires répétées et anarchiques requièrent la synthèse continue de tous les composants cellulaires nécessitant l'intervention des chaperons. De surcroît, le CQP faciliterait les changements morphologiques des cellules pendant la division cellulaire et les systèmes de dégradation permettent la progression du cycle via la dégradation ciblée de certaines protéines comme les cyclines (Chang, Xu, et Luo 2003; Werner et al. 2013; Belaid et al. 2013). L'ensemble de ces conditions peuvent rapidement aboutir à une surcharge des capacités d'action des acteurs de la protéostasie engendrant un risque accru d'accumulation de protéines dénaturées. Pour pallier à ce problème, les cellules cancéreuses surexpriment divers acteurs du CQP, démontré par exemple par les niveaux de HSP et de co-chaperons moléculaires élevés qui ont été observés dans la plupart des cancers humains par rapport à leurs tissus sains d'origine (Calderwood et Gong 2016; Calderwood et Murshid 2017). D'ailleurs, la corrélation entre la surexpression des chaperons et co-chaperons moléculaires et la survie des cellules cancéreuses a fait émerger le concept de « dépendance » aux chaperons, plaçant de ce fait ces protéines comme les gardiens de la protéostasie des cellules cancéreuses (Sherman et Gabai

2015). Notamment, une surexpression de BAG3, co-chaperon de HSP70 et de HSPB8 (décrit paragraphe 1.3.1) dans de nombreuses cellules tumorales, accompagnerait entre autres une diminution de l'apoptose, une résistance accrue à la chimiothérapie et un mauvais pronostic (Rosati et al. 2012; Behl 2016). De plus, une expression élevée de BAG3, comme de son partenaire HSPB8, favorise la progression tumorale et le processus métastatique via la modulation de la prolifération, de l'adhésion, de la migration ou encore de l'invasion (section 1.3.4.2.2). Ainsi, la régulation des systèmes de dégradation et du niveau protéique des chaperons et de leurs co-chaperons constituent visiblement un point de contrôle critique pour la viabilité cellulaire. Comprendre comment les cellules maintiennent l'intégrité de leur protéome constitue donc un enjeu biologique et médical primordial.

Dans les prochaines sections, nous décrirons les fonctions et les modes de régulation des HSPB, famille à laquelle appartient une des protéines d'intérêt du laboratoire, HSPB8. Les systèmes de dégradation seront brièvement présentés mais l'attention se portera surtout sur la voie de dégradation par autophagie sélective. Nous détaillerons aussi les fonctions d'une protéine possédant une fonction centrale dans l'autophagie sélective : le récepteur autophagique p62/SQSTM1 (« *Sequestosome 1* ») et nous explorerons également ses fonctions non-autophagiques. D'une manière globale, l'emphase sera principalement mise sur les rôles de ces acteurs du CQP en lien avec le maintien de l'intégrité et/ou une modulation dynamique du cytosquelette d'actine.

1.2.1.2. Les petites protéines de choc thermique HSPB et le cytosquelette d'actine.

Les HSPB sont comprises entre 12 à 42 kDa selon les espèces et fonctionnent de manière indépendante de l'ATP (Jakob et al. 1993). L'importance physiologique des HSPB est soulignée par leur omniprésence dans différentes niches, à savoir les archées, les bactéries et les eucaryotes (Jong et al. 1993; Montagna, Matuschewski, et Buscaglia 2012). Ces chaperons sont caractérisés par la présence d'un domaine α -cristallin hautement conservé au sein de l'évolution qui est flanqué de séquences N- et C-terminales variables (Plesofsky-Vig, Vig, et Brambl 1992; Jong et al. 1993; de Jong, Caspers, et Leunissen 1998; Franck et al. 2004). En outre, la structure du domaine α -cristallin est essentielle à la fonction des HSPB (Baranova et al. 2009; Kim, Kim, et Kim 1998). Ainsi, des mutations déstabilisant la structure de ce domaine sont souvent associées au développement de myopathies et de neuropathies (Bakthisaran, Tangirala, et Rao 2015). Chez l'humain, la famille des HSPB regroupe dix membres (HSPB1-10) dont l'expression peut être ubiquitaire dans l'organisme telle que pour HSPB1, HSPB6 et HSPB8, mais peut être tissu-spécifique comme HSPB7 qui est

principalement exprimée dans le cœur et les muscles (Kappé et al. 2003; Morrow et Tanguay 2012; Bakthisaran, Tangirala, et Rao 2015).

Ces chaperons moléculaires forment la première ligne de défense de la cellule lors d'un stress protéotoxique en prévenant l'agrégation irréversible des protéines dénaturées (Haslbeck et al., 2015). De ce fait, les HSPB ont été impliquées dans la prévention de l'agrégation de protéines impliquées dans différentes pathologies comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Shammas et al. 2011; King et al. 2009; Cox et Ecroyd 2017; Dehle et al. 2010; Golenhofen et Bartelt-Kirbach 2016). Dans cette section, nous décrivons le modèle actuel qui prévaut sur le mode de régulation des HSPB puisqu'elles possèdent un fonctionnement particulier par rapport aux chaperons à activité ATPase. Nous exposerons aussi les implications de ces chaperons en lien avec le cytosquelette d'actine en conditions de stress et physiologiques.

1.2.1.2.1. Séquestration des protéines endommagées et chaperons de la famille HSPB.

Il est important de noter que les HSPB sont exprimées de façon constitutive chez les eucaryotes supérieurs. Un rôle leur est attribué dans plusieurs processus physiologiques dont le développement, la différenciation, la mobilité cellulaire ou encore l'apoptose (Wettstein et al. 2012; Morrow et Tanguay 2012; Bakthisaran, Tangirala, et Rao 2015; Carra et al. 2017). Chez l'humain, elles sont par exemple fortement exprimées dans les cellules hautement différenciées, comme dans les cellules musculaires ou neuronales, où elles maintiennent la protéostasie en protégeant les cellules de l'agrégation des protéines dénaturées d'où leur implication dans différentes myopathies et neuropathologies (Taylor et Benjamin 2005; Dubińska-Magiera et al. 2014; Boncoraglio, Minoia, et Carra 2012; Zhu et Reiser 2018; Carra et al. 2017).

Néanmoins, leur rôle a été particulièrement démontré en condition de stress (Bakthisaran, Tangirala, et Rao 2015; Carra et al. 2017). Les HSPB sont considérées comme une première ligne de défense pour contrer l'agrégation protéique du fait qu'elles sont capables de lier directement les protéines endommagées et par conséquent, préviennent des interactions non spécifiques et de leur agrégation irréversible. Même si leur mode d'action demeure encore à ce jour controversé et peu compris, cette fonction des HSPB est suggérée s'opérer via leur oligomérisation (Leroux et al. 1997; Giese et Vierling 2002; Lentze et Narberhaus 2004). Le modèle qui prévaut concernant leur mode d'action canonique, est que les HSPB s'associeraient en de larges homo- ou hétéro-oligomères, à partir de dimères, afin d'effectuer leur fonction de « *holdase* » ou « *agrégase* » (cf.

fig. 1.6). Ce terme provient du fait qu'en s'associant avec des protéines en voie de dénaturation ou dénaturées, les HSPB vont généralement s'agréger avec ces dernières. Les oligomères de HSPB formeraient des réservoirs d'intermédiaires de repliement permettant le maintien des protéines endommagées dans un état stable dit « compétent » (Ungelenk et al. 2016). Ensuite ces protéines endommagées seraient présentées par les HSPB aux autres systèmes chaperons dépendants de l'ATP pour permettre leur repliement dans leur conformation native ou leur dégradation le cas échéant (Garrido et al. 2012). Par ailleurs, l'interaction des HSPB avec des protéines agrégées modifieraient la structure des agrégats de façon à faciliter leur re-solubilisation par des systèmes chaperons spécialisés. Chez la levure par exemple, les petites HSP agiraient comme facteurs de triage spatial pour permettre la formation de différents types d'agrégats (Hill et al. 2017). Cependant, la fonction précise de cette famille chez les mammifères, leur régulation et leurs protéines clients demeurent encore à ce jour très peu compris.

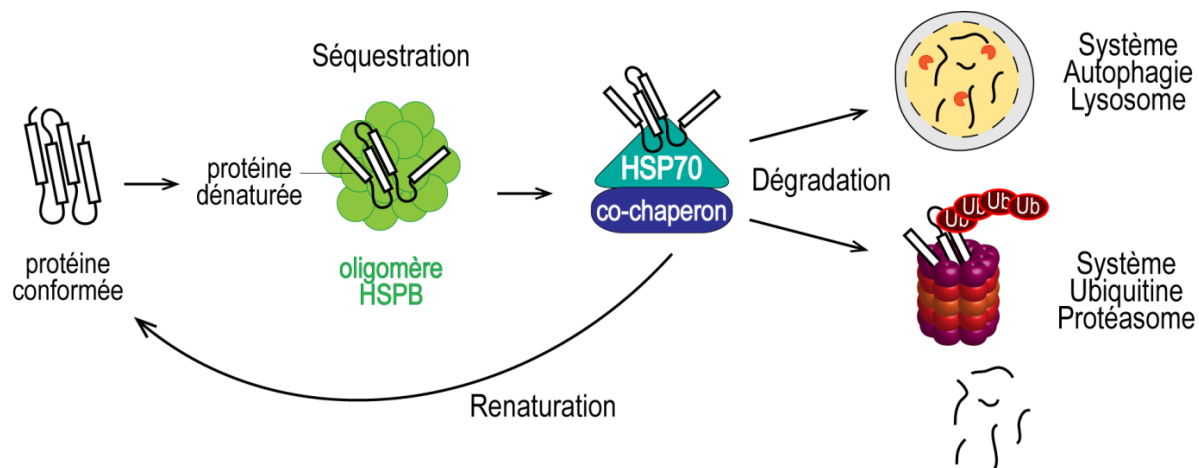


Figure 1.6 : Fonction de « holdase » des HSPB (Garrido et al. 2012).

L'oligomérisation est dépendante de la structure du domaine α -cristallin via le motif IXI/V (isoleucine-X-isoleucine ou valine) et des extrémités N- et C-terminales variables des HSPB qui définiraient la taille des oligomères (Lentze et Narberhaus 2004; Basha, Friedrich, et Vierling 2006; Mchaourab, Godar, et Stewart 2009). Ces oligomères sont polydispersés, c'est à dire qu'ils présentent une large variation tant dans leur nombre que dans leur organisation spatiale (Mchaourab, Godar, et Stewart 2009). De plus, une dynamique d'oligomérisation appropriée et d'échange actif de sous-unités au sein des oligomères serait critique pour l'activité chaperon des HSPB, car la perturbation de ces processus par l'introduction de mutations ou de troncations des régions N- et C-terminales ou du domaine α -cristallin conduit à une perte de l'activité chaperon (Giese et Vierling 2002; Studer et al. 2002; Lentze, Studer, et Narberhaus 2003; Giese et Vierling

2004). De surcroît, il a été montré que l'oligomérisation dynamique répond à des stimuli telles que des contraintes thermiques (Haslbeck et Vierling 2015). Ainsi, l'oligomérisation dynamique constitue une propriété essentielle au cœur de la fonction des HSPB et est soumise à une régulation par la signalisation, en outre via une modulation de la phosphorylation de ces protéines.

1.2.1.2.2. *Mode de régulation par phosphorylation et modulation du cytosquelette d'actine par les HSPB.*

La phosphorylation des HSPB est supposée stimuler la dynamique d'oligomérisation et l'échange de sous-unités ce qui favoriserait leur fonction en conditions physiologiques, ainsi qu'une réponse adaptative aux stimuli de stress (Arrigo and Gibert, 2012; Landry and Huot, 1999; Welsh and Gaestel, 1998). La phosphorylation faciliterait la dissociation des oligomères en dimères, tandis que la déphosphorylation favoriserait plutôt l'oligomérisation en espèces de haut poids moléculaires (fig. 1.8; Rogalla et al. 1999; Lanneau et al. 2008; Arrigo et Gibert 2012; Suss et Reichmann 2015; Haslbeck et Vierling 2015). Cette dynamique fournirait un mécanisme de régulation de l'activité et/ou de la localisation des HSPB (van Montfort et al. 2001; Aquilina et al. 2004; Hayes et al. 2009; Acunzo, Katsogiannou, et Rocchi 2012; Boncoraglio, Minoia, et Carra 2012b; Bakthisaran et al. 2016). Le modèle prototype actuel de la famille, le plus étudié et le mieux compris, concerne la protéine HSPB1 (Guilbert, Varlet et al, 2015). En réponse à des stimuli physiologiques ou de stress, la dynamique d'oligomérisation de HSPB1 est modulée par phosphorylation, via la voie de signalisation p38-MAPK (« *Mitogen-Activated Protein Kinase* »)(Guilbert et al. 2015; Lavoie, Hickey, et al. 1993; Lavoie, Lavoie et al. 1995; Thiéroult et al. 2004). Notamment, cette fonction de HSPB1 s'inscrit dans une voie de modulation du cytosquelette d'actine (fig. 1.7).

Les études pionnières menées par Lavoie et al, dans les années 90 ont montré d'une part, que la phosphorylation de HSPB1 agit pour prévenir les modifications sévères de l'architecture du cytosquelette d'actine en réponse à divers stress (Lavoie, Gingras-Breton, et al. 1993). Par exemple, HSPB1 favorise la survie cellulaire en présence d'un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (cytochalasine D) de manière dépendante de sa phosphorylation (Lavoie, Gingras-Breton, et al. 1993). Cet effet protecteur a été corrélé avec des changements d'organisation du cytosquelette d'actine lors de la surexpression de HSPB1 (Lavoie et al. 1995). D'autre part, en réponse à des facteurs de croissance et à la dynamique membranaire, Lavoie et al, ont découvert que la phosphorylation de HSPB1 joue également un rôle central pour faciliter le remodelage de F-actine (Lavoie, Hickey, et al. 1993; Lavoie et al. 1995). En outre, un mutant de phosphorylation de HSPB1 exerce un effet dominant négatif et inhibe le remodelage du cytosquelette d'actine en réponse aux

facteurs de croissance. Enfin, la signalisation p38-MAPK est activée en réponse à l'étirement des cellules induisant un renforcement des fibres de stress et par conséquent stabilise le cytosquelette d'actine. Récemment, il a été montré que HSPB1 est phosphorylée, de façon dépendante de p38-MAPK, et s'accumule au niveau de l'actine qui émane des FA dans des cellules stimulées par l'étirement (Hoffman et al. 2017). Ceci favorise le renforcement des fibres de stress des fibroblastes en culture soumis à des étirements cycliques et contribuerait à diminuer la migration cellulaire. Cette étude a donc mis en évidence que HSPB1, via la voie p38-MAPK, est impliquée dans la transduction de signaux mécaniques influençant ainsi le remodelage de l'actine et la migration cellulaire (Hoffman et al. 2017).

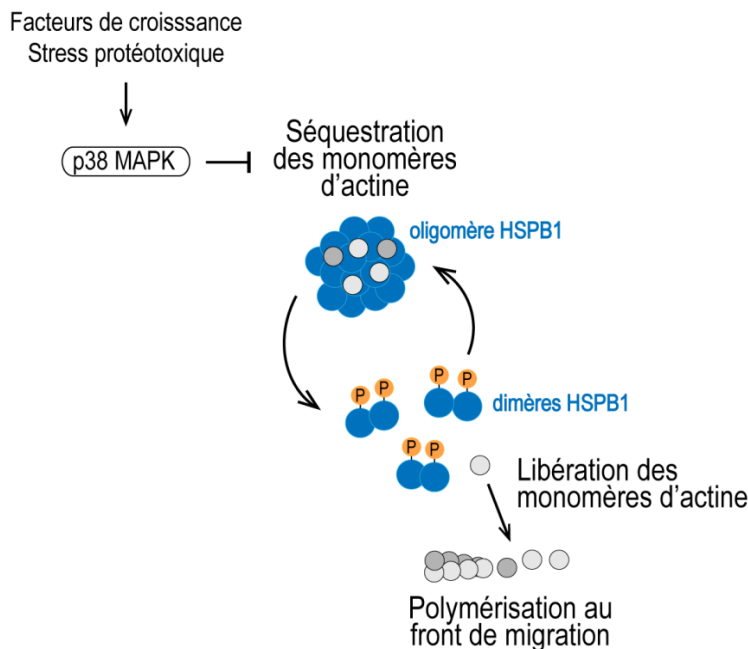


Figure 1.7 : Modèle du mode d'action de HSPB1, par modulation de sa phosphorylation, dans la régulation de la polymérisation d'actine et la motilité cellulaire (Guilbert et al. 2015). HSPB1, séquestrerait les monomères d'actine limitant ainsi la dynamique du cytosquelette d'actine sous forme de larges oligomères non phosphorylés. La phosphorylation de la protéine, via la voie signalétique p38-MAPK, induirait alors une dissociation des oligomères de HSPB1 en dimères provoquant une libération de l'actine monomérique. Ce processus stimulerait ainsi la dynamique du cytosquelette d'actine dans des régions où le renouvellement des filaments d'actine est important comme par exemple au front de migration des cellules (Lavoie, Hickey, et al. 1993; Lavoie, Gingras-Breton, et al. 1993; Lavoie et al. 1995).

Une fonction protectrice du cytosquelette d'actine par d'autres HSPB que HSPB1 a été reportée, suggérant qu'une telle fonction pourrait donc être une caractéristique commune de cette famille de chaperons moléculaires (Mounier et Arrigo 2002; Clarke et Mearow 2013; Miron, Wilchek, et Geiger 1988; Verschuure et al. 2002; Brophy, Lamb, et Graham 1999). En effet, de nombreux processus nécessitant un remodelage rapide de la F-actine, tels que la migration, l'adhésion et la différenciation cellulaire, ou encore l'EMT, sont facilités par les HSPB (Piotrowicz, Hickey, et Levin 1998; Davidson et Morange 2000; Lee et al. 2008; Montagna, Matuschewski, et Buscaglia 2012; Lahvic et al. 2013; Shimizu, Tanaka, et Atomi 2016; Park et al. 2016).

Notamment, celles-ci ont une importance centrale dans le développement et la différenciation des muscles squelettiques et jouent un rôle potentiellement important dans l'homéostasie des muscles (Dubińska-Magiera et al. 2014). Elles sont fortement exprimées dans les muscles squelettiques ce qui les protègent des stress oxydatifs et mécaniques, en particulier pendant l'exercice. Lors d'une activité musculaire intense, une lésion des fibres musculaires peut survenir suite à l'augmentation significative de la température. L'implication de certaines HSPB dans le maintien de l'organisation du cytosquelette en cas d'hyperthermie a été postulée (Dubińska-Magiera et al. 2014). Par exemple, un exercice répété chez l'homme induit l'accumulation de HSPB1 et HSPB5 dans les structures myofibrillaires, en particulier dans les disques Z (Paulsen et al. 2009). La fonction des HSPB dans ces conditions serait de stabiliser et de protéger les structures myofibrillaires pendant et après un exercice inhabituel (Paulsen et al. 2009). Aussi, il a été montré que HSPB5 empêchait la dénaturation et l'agrégation de myosine II dans ces conditions, ce qui permettait de maintenir les propriétés enzymatiques de la myosine et donc l'activité contractile musculaire (Melkani, Cammarato, et Bernstein 2006). Il n'est donc pas surprenant que des mutations des HSPB ont largement été associées au développement de pathologies sévères présentant une désorganisation du cytosquelette d'actine comme des neuropathies et des myopathies (Cappola et al. 2010; Stoevring, Frederiksen, et Christiansen 2007; Irobi et al. 2004; Evgrafov et al. 2004; Bova et al. 1999).

Enfin, une étude a montré qu'une contraction forcée des cardiomyocytes (mimant une sorte de tachycardie *in vitro*) induit une augmentation du nombre de fibres de stress qui est contrée par la surexpression de HSPB1, HSPB6, HSPB7 et HSPB8 (Ke et al. 2011). Les résultats suggèrent que HSPB1, HSPB6 et HSPB7 empêcheraient la formation des fibres de stress en inhibant l'incorporation des monomères d'actine dans les filaments ou en stimulant la dépolymérisation de la F-actine. De manière surprenante, HSPB8 agirait directement sur l'activation de la GTPase RhoA (Ke et al. 2011).

En résumé, plusieurs points importants ressortent de ces études : 1) les HSPB sont donc impliquées dans les mécanismes de modulation du cytosquelette d'actine en réponse à des stimuli mécaniques, les liant possiblement à la mécanotransduction ; 2) remarquablement, le mode d'action de HSPB8 semble distinct de celui de HSPB1 et des autres HSPB. D'ailleurs, en ligne avec ce point, il s'avère que certaines HSPB, comme HSPB8, n'arborent pas de motif IXI/V essentiel à l'oligomérisation des HSPB et ne semblent pas former de larges oligomères (Studer et al. 2002; Carra et al. 2008; Quinlan et al. 2013; Zhou et al. 2016). De ce fait, HSPB8 est retrouvée principalement sous la forme de dimères, suggérant un autre mode d'action pour ce chaperon (Carra et al. 2008).

Corroborant cette idée, l'activité chaperon des HSPB qui forment des oligomères ne ferait pas intervenir de co-chaperons moléculaires (contrairement aux autres HSP), alors que HSPB8 qui agirait dans la plupart de ses fonctions de concert avec le co-chaperon moléculaire BAG3 (Carra et al. 2008). HSPB8 semble donc être un membre particulier au sein de sa famille.

Notre laboratoire s'est intéressé au complexe chaperon particulier formé de BAG3 et HSPB8 dont les caractéristiques et fonctions seront le point de discussion majeur des sections (1.3 et 1.4.4). En outre, une des fonctions principales de ce complexe est associée au CQP via la régulation de la dégradation ciblée de protéines endommagées par un processus appelé autophagie sélective (Carra et al. 2008; Kwok et al. 2011). Ainsi, avant de décrire et discuter des fonctions connues du complexe BAG3-HSPB8, nous introduisons le processus d'autophagie sélective et ses acteurs principaux.

1.2.1.3. Systèmes de dégradation ciblée des protéines : focus sur l'autophagie sélective.

Le système ubiquitine-protéasome serait responsable de la dégradation des protéines à courtes demi-vies ou endommagées (Hershko et Ciechanover 1998) tandis que le système autophagie-lysosome assimilerait plutôt les protéines à longues demi-vies et les structures qui ne sont pas digestibles par le protéasome, par exemple, les agrégats protéiques et les organelles endommagées, et possiblement des structures du cytosquelette (Awan et Deng 2014). Ces voies de dégradation assurent l'homéostasie de la cellule en dégradant les composants indésirables. De manière importante, elles favorisent également la dégradation spatio-temporelle fine de certains substrats, contribuant alors à la signalisation cellulaire et au bon déroulement de divers processus cellulaires. Une telle fonction est bien établie pour le système ubiquitine-protéasome, notamment au cours de la mitose (cf. section 1.4.1.2). Par contre, seulement quelques exemples épars se partagent les évidences d'un tel rôle pour l'autophagie. Ceci va de pair avec le fait que l'autophagie émerge seulement depuis quelques années comme un processus pouvant être sélectif. Quelques-uns de ces exemples seront décrits paragraphe 1.4.1.2 et 1.4.3, mais tout d'abord, nous décrirons brièvement les fonctions majeures de l'ubiquitination des protéines, ainsi que le principe de base de l'autophagie sélective et l'un des acteurs principaux participant à ce processus : p62/SQSTM1.

1.2.1.3.1. L'ubiquitination des protéines, bien plus qu'un signal de dégradation.

L'ubiquitination d'une protéine implique une cascade enzymatique séquentielle qui résulte en la liaison covalente d'une molécule d'ubiquitine sur un résidu lysine du substrat protéique. L'étape finale de ligation et la spécificité du substrat est conférée par la famille des ubiquitines ligases (Hershko et Ciechanover 1998; Kirkin et al. 2009). Cette modification post-traductionnelle ubiquitaire, peut aboutir à l'ajout d'une unique ubiquitine (mono-ubiquitination) ou d'une chaîne d'ubiquitine (poly-ubiquitination). Pour former une chaîne de polymères, les molécules d'ubiquitine successives sont toujours liées spécifiquement à l'un des sept résidus de lysine (annotés selon sa position dans la molécule d'ubiquitine soit K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63) ou à la méthionine N-terminale (M1), de la molécule d'ubiquitine précédente (Ikeda et Dikic 2008; Komander et Rape 2012).

De la même manière que la phosphorylation, l'ubiquitination des protéines cibles constitue un code, le code ubiquitine, qui permet le recrutement de protéines possédant des domaines de liaison à l'ubiquitine (« *Ubiquitin Associated* » ou UBA), dont des protéines de signalisation qui traduisent le code de l'ubiquitine pour remplir une myriade de fonctions biologiques spécifiques et non protéolytiques (Chen et Sun 2009). Notamment, l'ubiquitination peut réguler l'activité et la localisation d'une protéine ou son interaction avec des partenaires et est impliquée par exemple dans le trafic vésiculaire, l'activation des protéines kinases ou la réparation de l'ADN. Ces fonctions non protéolytiques du code de l'ubiquitine sont souvent la conséquence de la monoubiquitylation ou de la formation de chaînes liées M1, K6, K11 et K63 (Komander et Rape 2012).

Le code ubiquitine fait également partie intégrante du système protéolytique et joue un rôle important dans la corrélation entre la dégradation des protéines et différentes activités du réseau de la protéostasie. La dégradation médiée par l'ubiquitination des protéines joue un rôle important dans le contrôle de processus cellulaires critiques, notamment la progression du cycle cellulaire, la transduction de signaux biologiques ou encore la régulation de la transcription (Hershko et Ciechanover 1998). Le triage des protéines ubiquitinées dépend entre autres de la longueur de la chaîne d'ubiquitine et des types de liaison. Par exemple, l'ubiquitine ligase CHIP (« *Carboxyl terminus of HSC70-Interacting Protein* ») régit la décision de triage entre le repliement du substrat et sa dégradation induite par le protéasome (Connell et al. 2001). La chaîne K48 est considérée comme un signe classique de dégradation protéasomale (Ciechanover et Stanhill 2014) et K63 est un marqueur commun dans le processus d'autophagie sélective (Tan et al. 2008). Cependant, des

études récentes ont révélé que le protéasome, tout comme l'autophagie, semblent accepter de nombreux types de chaînes d'ubiquitine (Liu et al. 2016).

1.2.1.3.2. Système de dégradation des composants cellulaires par autophagie sélective.

Le système autophagie-lysosome est hautement conservé chez les cellules eucaryotes et consiste en la dégradation de substrats par le lysosome (Ravikumar et al. 2010). La macroautophagie (nommée ci-après autophagie) est caractérisée par la formation de vésicules cytoplasmiques à double membrane, les autophagosomes, qui séquestrent et livrent aux lysosomes des protéines et des organelles endommagées ou surnuméraires, des protéines à longues demi-vies, de larges agrégats protéiques ou des pathogènes intracellulaires (fig. 1.8; Ravikumar et al. 2010; Yoshii et Mizushima 2017). En condition physiologique, ce processus est constitutivement actif et maintenu à un niveau basal faible par mTORC1 (« *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1* »), un senseur clé du métabolisme et de la croissance cellulaire (Dunlop et Tee 2014). Par contre, le flux autophagique peut être augmenté en condition de stress (privation en nutriments, stress oxydant, accumulation de protéines agrégées) et fonctionne alors comme une réponse cyto-protectrice (Ravikumar et al. 2010).

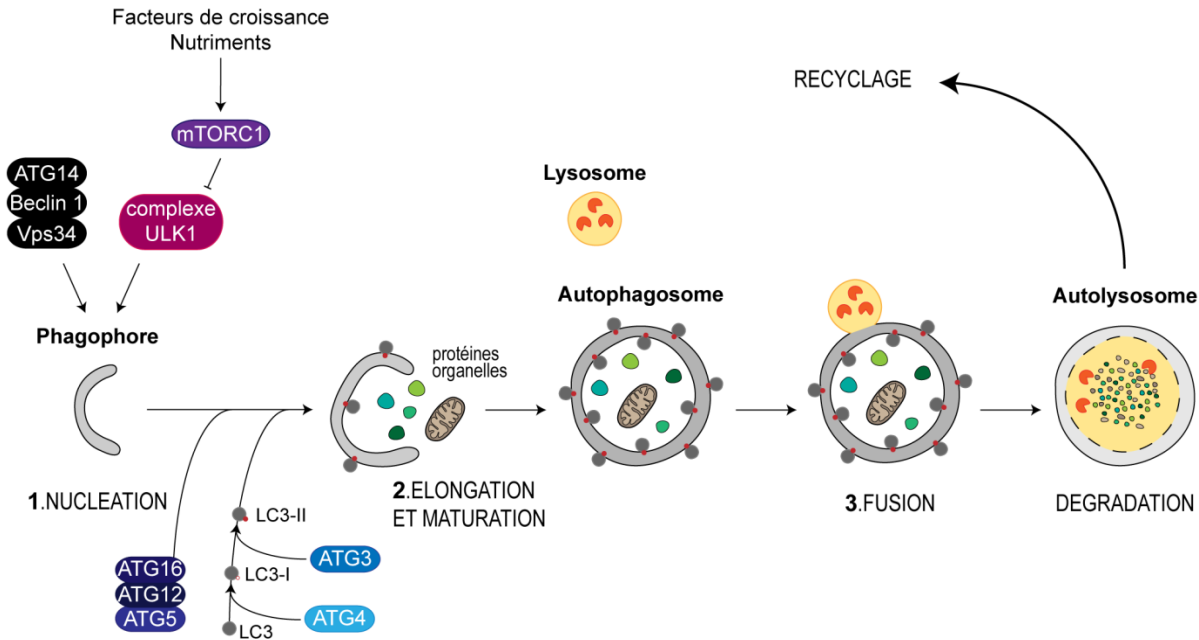


Figure 1.8: Schéma de la voie d'induction de l'autophagie, étapes de formation et de dégradation de l'autophagosome (Mizushima et Komatsu 2011; Rubinsztein, Bento, et Deretic 2015). Les étapes nécessaires dans le processus autophagique sont régulées par une classe de gènes nommés « gènes reliés à l'autophagie » (« *AuTophagy-related genes* » ou ATGs ; Ryter, Cloonan, et Choi 2013; Feng et al. 2014; Awan et Deng 2014). La première étape de l'autophagie est l'initiation qui permet la nucléation (1) du

phagophore. Cette étape est déclenchée par l'activation du complexe Beclin-1-Vps34 (« *Vacuolar Protein Sorting* »)-ATG14 et du complexe ULK1 (« *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1* ») suivant l'inhibition de mTORC1. La seconde étape correspond à la maturation (2) du phagophore qui va être enrichi des marqueurs autophagiques spécifiques dérivés de la maturation post-traductionnelle de protéines, comme la lipitation de LC3, induite par les protéines ATG. De manière concomitante, le phagophore s'allonge (2) et englobe les cargos cytoplasmiques pour former l'autophagosome. La dernière étape consiste en la fusion (3) de l'autophagosome avec les lysosomes, formant un compartiment de dégradation (4) nommé l'autolysosome dans lequel le cargo sera digéré. Enfin, après dégradation, les composants sont exportés vers le cytoplasme pour être recyclés.

L'autophagie est initiée par la nucléation d'une double membrane isolée nommé phagophore. Pendant sa maturation, des marqueurs autophagiques spécifiques telle que la protéine LC3 lipidée (LC3-II ; « *microtubule-associated protein 1A/1B Light Chain 3* ») vont s'intégrer dans ses membranes interne et externe (fig. 1.8). Ce mécanisme joue un rôle crucial dans la sélection du matériel cytoplasmique qui est conduit à la dégradation. Pendant l'enrichissement de la membrane, le phagophore s'allonge, englobe le cargo cytoplasmique conduisant à la formation d'une vésicule à double membrane mature : l'autophagosome (fig. 1.8). Celui-ci va alors fusionner avec les lysosomes afin de procéder à la dégradation des substrats par les enzymes protéolytiques du lysosome (Mizushima et Komatsu 2011; Rubinsztein, Bento, et Deretic 2015). Lors d'une privation en nutriments par exemple, l'inhibition de mTORC1 induit l'autophagie permettant ainsi la dégradation des composants cellulaires pour recycler entre autres des acides aminés et des lipides afin de lutter contre le stress (fig. 1.8). De ce fait, l'autophagie a été décrite pendant de nombreuses années comme une réponse catabolique non spécifique qui favorise la survie cellulaire par le recyclage de macromolécules lors d'un stress métabolique (Rabinowitz et White 2010).

Cependant, au cours des dernières années, une quantité croissante d'évidences a montré que l'autophagie peut également être un processus très spécifique et hautement sélectif (Komatsu et Ichimura 2010; Rogov et al. 2014). Le terme *autophagie sélective* se réfère à la dégradation ciblée par autophagie de structures cellulaires ou de certaines protéines. Plusieurs types sont à présent répertoriés, correspondant à la dégradation d'organelles endommagées ou surnuméraires (mitophagie, ribophagie...), des micro-organismes (xénophagie), de protéines agrégées (agréphagie) ou encore des protéines spécifiques, dénaturées ou non, et/ou superflues (Belaid, Cerezo, et al. 2013; Ulbricht, Arndt, et Höhfeld 2013; Rogov et al. 2014).

L'élément clé de la sélectivité de ce processus est la reconnaissance des substrats et leur ciblage vers la machinerie autophagique par les récepteurs autophagiques, telles que les protéines p62/SQSTM1 ou NBR1 (« *Neighbors to BRCA1 gene 1 protein* »). En l'occurrence, la découverte et la caractérisation de ces protéines a constitué une étape charnière vers la compréhension de

l'autophagie sélective (Johansen et Lamark 2011; Shaid et al. 2013; Rogov et al. 2014). Notamment, un récepteur autophagique doit remplir trois fonctions essentielles : 1) reconnaître les substrats, souvent marqués par des chaînes de poly-ubiquitine K63; 2) interagir avec la protéine autophagosomale LC3, qui agit comme adaptateur, fixant ainsi les cargos à la surface de la membrane interne du phagophore en croissance et 3) avoir la capacité de se polymériser et de s'assembler en de larges structures moléculaires (détectables par microscopie optique), qui offre une « plateforme » pour permettre la co-agrégation avec le cargo à dégrader et la formation du phagophore (Johansen et Lamark 2011; Rogov et al. 2014; Lamark, Svenning, et Johansen 2017). La polymérisation des récepteurs émerge comme une propriété cruciale et essentielle pour séquestrer et orchestrer la dégradation ciblée des composants cellulaires par le système autophagolysosome (Lamark, Svenning, et Johansen 2017). Les mécanismes qui contrôlent l'assemblage moléculaire des récepteurs de l'autophagie sont donc fondamentaux pour la protéostasie et les connaissances actuelles demeurent largement fragmentaires.

Par ailleurs, ces mécanismes de séquestration des protéines régulés par les récepteurs autophagiques des protéines se révèlent particulièrement importants lors de conditions où les systèmes de dégradation sont « surmenés » induisant une augmentation de la protéotoxicité (Sontag, Samant, et Frydman 2017). Une surcharge des systèmes de dégradation protéolytique peut être provoquée par exemple, par des traitements qui inhibent le protéasome, par le vieillissement (lié à la diminution de la capacité de prise en charge des systèmes de dégradation (Balchin, Hayer-Hartl, et Hartl 2016) ou encore par une synthèse protéique de masse comme c'est le cas dans les cellules cancéreuses causée en outre par les divisions cellulaires rapides et répétées.

Enfin, la séquestration de protéines dans des inclusions cellulaires contrôlées et localisées à des endroits précis dans la cellule, s'inscrit dans les divers processus de protection que les cellules ont développés pour résister à une accumulation de protéines endommagées ou superflues (Wolff, Weissman, et Dillin 2014; Sontag, Samant, et Frydman 2017). Ces inclusions cellulaires sont de natures diverses et définissent, entre autres, des systèmes de compartimentation d'agrégats protéiques. Les mécanismes impliqués dans la formation et le ciblage des protéines ont été caractérisés particulièrement chez la levure, où les petites HSP et l'ubiquitination semblent jouer un rôle important dans le triage des protéines vers différents types d'inclusions (Hill et al. 2017).

Dans les cellules mammifères, l'exemple le mieux caractérisé est la formation de l'agrésome en réponse à une surcharge du protéasome. L'agrésome correspond à la compartimentation contrôlée

de dépôts agrégés au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC = « *Microtubule Organization Center* »). Cette structure permet à la cellule de séquestrer les protéines endommagées, de se protéger de leur toxicité et faciliterait leur élimination par agréphagie en favorisant le recrutement des systèmes chaperons et de la machinerie autophagique (Johnston, Ward, et Kopito 1998; Kopito 2000; Lamark et Johansen, 2012; Hyttinen et al. 2014). De ce fait, la formation d'inclusions de protéines et leur transport à l'agrésome sont donc considérés comme un mécanisme de cytoprotection pour séquestrer les protéines néfastes (Kopito 2000). En outre, p62/SQSTM1, premier récepteur autophagique identifié (Joung, Strominger, et Shin 1996; Vadlamudi et al. 1996; Johansen et Lamark 2011) et le plus étudié (Bjørkøy et al. 2005; Wooten et al. 2008), assure la formation de ces inclusions et participe à leur transport vers l'agrésome en collaboration avec la déacétylase cytoplasmique HDAC6. De manière importante, des travaux récents du laboratoire ont montré que ces deux fonctions sont facilitées par le complexe BAG3-HSPB8 (Guilbert et al. 2018).

Ainsi, il semble que la compartimentation spatiale des protéines endommagées ou superflues ne soit pas une stratégie secondaire, mais plutôt une stratégie complémentaire qui agit en parallèle avec les autres mécanismes de contrôle de qualité. Néanmoins, les mécanismes impliqués dans la formation d'inclusions demeurent à ce jour peu compris chez les mammifères.

La prochaine section traitera des fonctions de p62/SQSTM1, qui outre son rôle de récepteur autophagique, est une protéine multifonctionnelle qui a d'abord été identifiée comme une protéine d'échafaudage dans des voies de signalisation clés incluant le facteur nucléaire NF- κ B (« *Nuclear Factor-kappa B* »). De plus, p62/SQSTM1 émerge comme un senseur des niveaux d'ubiquitine dans les cellules et son assemblage moléculaire au sein d'inclusions nommées « *p62 bodies* » ne serait pas uniquement destiné à la dégradation. Nous exposerons la fonction de p62/SQSTM1, en lien avec sa capacité à oligomériser, qui favoriserait entre autres la dégradation par autophagie sélective des protéines ubiquitinées K63.

1.2.1.4. Exploration de la multifonctionnalité de la protéine p62/SQSTM1 : l'oligomérisation détermine sa fonction.

P62, également appelée séquestosome 1 (ci-bas appelé p62), est un « centre » de signalisation multifonctionnel et un récepteur autophagique, fonctions conférées par ses nombreux domaines d'interactions (fig.1.9). Ceux-ci lui permettent par exemple d'activer la détection des nutriments

dépendant de mTORC1 (Linares et al. 2015), les réponses inflammatoires médiées par NF- κ B (Nakamura et al. 2010), la réponse au stress oxydatif activée par Nrf2 (« *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2* »)(Taniguchi et al. 2016), ainsi que d'assurer l'autophagie sélective des cargos ubiquitinés (Bjørkøy et al. 2005; Pankiv et al. 2007; Itakura et Mizushima 2011). Le terme « séquestosome » provient de l'observation initiale que p62 se lie préférentiellement aux chaînes de poly-ubiquitine et forme « un nouveau lieu de stockage cytoplasmique » pour les protéines ubiquitinées (Shin 1998).

Chez l'humain, p62 est une protéine de 440 acides aminés (62 kDa), ubiquitaire dans l'organisme (Joung, Strominger, et Shin 1996), qui présente une localisation principalement cytoplasmique, mais peut transloquer au noyau, aux autophagosomes et aux lysosomes (Pankiv et al. 2010; Katsuragi, Ichimura, et Komatsu 2016). La prochaine partie décrira donc les fonctions de p62 dans l'autophagie sélective.

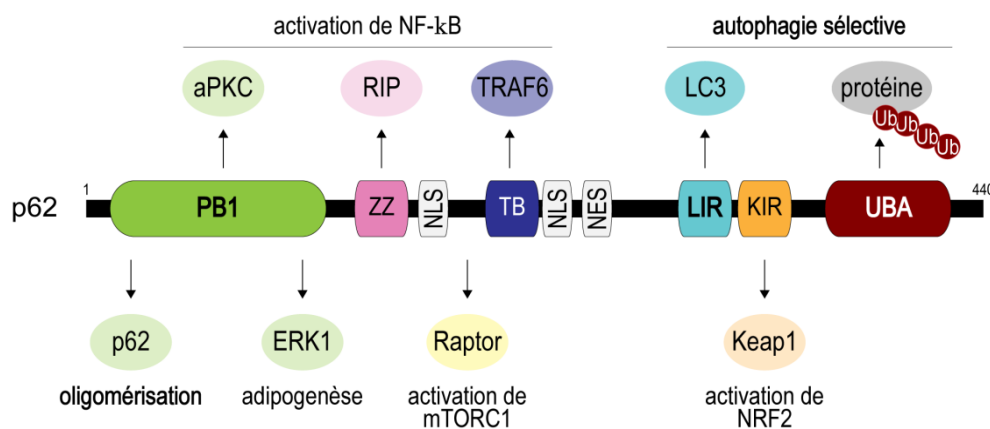


Figure 1.9: Structure de p62, domaines et partenaires d'interaction (Katsuragi, Ichimura, et Komatsu 2016). En N-terminal, les domaines Phox1 et Bem1p (PB1) assurent l'association avec d'autres protéines contenant un domaine PB1 telle que p62 lui-même, NBR1, la kinase aPKC (« *atypical protein kinase C* ») et la kinase ERK1 (« *extracellular regulated kinase 1* ») par l'intermédiaire d'une homo- ou hétéro-oligomérisation. L'interaction de p62 avec ERK peut réguler négativement l'adipogenèse. Le domaine doigt de zinc (ZZ) et le domaine de liaison à TRAF6 (« *Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6* » binding ou TB) interagissent respectivement avec les protéines RIP et TRAF6 pour réguler la signalisation du facteur NF- κ B. Raptor, une sous-unité du complexe mTORC1, se lie à la région située entre ZZ et TB, et en association avec TRAF6 contribue à l'activation de mTORC1. P62 reconnaît LC3 par le biais de son motif LIR (« *LC3-interacting region* ») et aux chaînes de poly-ubiquitine via son domaine associé à l'ubiquitine (UBA, situé en C-terminal), jouant ensemble un rôle dans l'autophagie sélective. P62 interagit avec Keap1 (« *Kelch-like ECH-associated protein 1* ») via son domaine KIR (« *Keap1 Interacting Region* »), conduisant par séquestration de ce dernier à l'activation non canonique du facteur de transcription Nrf2 (Lau et al. 2010). NLS et NES indiquent respectivement le signal de localisation nucléaire et le signal d'exportation nucléaire.

1.2.1.4.1. *p62/SQSTM1, séquestrer pour mieux dégrader : une protéine essentielle pour la formation contrôlée d'inclusions de protéines ubiquitinées.*

La régulation positive de p62 est nécessaire aux cellules pour stimuler l'agrégation contrôlée des protéines endommagées, faciliter leur séquestration et induire leur dégradation par agrégation afin de résister à la protéotoxicité (Ichimura et Komatsu 2010; Kirkin et al. 2009; Komatsu et al. 2007; Pankiv et al. 2007; Bjørkøy et al. 2005). P62 régule la détection, la séquestration et le ciblage spécifique des protéines aux voies de dégradation protéasomale et autophagique (Liu et al. 2016). Nous nous intéresserons ici principalement à la fonction de p62 dans le processus d'autophagie sélective.

Trois domaines de p62 ont été identifiés comme étant essentiels pour sa fonction dans l'autophagie sélective (fig. 1.10) ; Joung, Strominger, et Shin 1996; Lin et al. 2013; Bjørkøy et al. 2005; Pankiv et al. 2007). Le domaine UBA, qui interagit avec une affinité plus élevée pour les chaînes de poly-ubiquitines sur K63, permet de diriger les substrats vers la machinerie autophagique (Wooten et al. 2008; Long et al. 2008; Olzmann et Chin 2008; Tan et al. 2008; Schreiber et Peter 2014). En outre, les chaînes d'ubiquitine les plus longues montrent une plus grande affinité pour p62 (Zaffagnini et al. 2018). L'interaction directe de p62 avec LC3, via le motif LIR, dans la membrane de l'autophagosome naissant et mature, favorise le ciblage des protéines ubiquitinées vers l'autophagosome (Pankiv et al. 2007; Shaid et al. 2013). De ce fait, p62 « co-agrège » avec ses substrats dans l'autophagosome devenant lui-même un des principaux substrats de l'autophagie sélective (Ichimura et Komatsu 2010; Lim et al. 2011). Enfin, le domaine PB1 confère à p62 sa capacité à polymériser et à former de larges assemblages moléculaires ordonnés nommés « *p62 bodies* » (Bjørkøy et al. 2005). Cette oligomérisation est nécessaire pour stabiliser l'interaction de p62 avec LC3 et les chaînes d'ubiquitine. Ainsi, l'oligomérisation permet à p62 de sélectionner simultanément la membrane du phagosome et le cargo ubiquitiné (Wurzer et al. 2015). Selon ce modèle, les « *p62 bodies* » initieraient le dépôt primaire et l'agrégation des protéines ubiquitinées, et serviraient également de plateforme pour l'assemblage de l'autophagosome (Ciuffa et al. 2015).

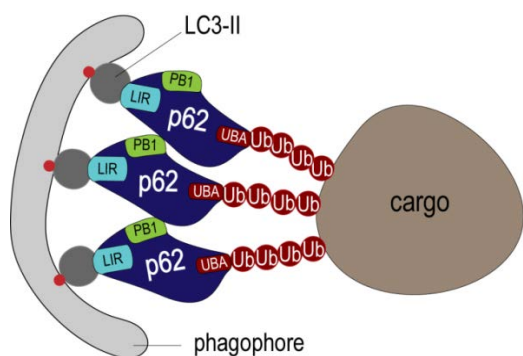


Figure 1.10 : Les domaines PB1, LIR et UBA de p62 engagent la séquestration des substrats ubiquitinés dans l'autophagosome (Lamark, Svenning, et Johansen 2017).

D'autre part, les « *p62 bodies* » seraient les précurseurs de l'assemblage de microagrégats de protéines ubiquitinées et de leur ciblage à l'agrésome (Bjørkøy et al. 2005; Ichimura, Kominami, et al. 2008; Kirkin et al. 2009; Ichimura, Kumanomidou, et al. 2008; Itakura et Mizushima 2011). En l'occurrence, la formation de cette structure de protection, dans un contexte d'inhibition du protéasome par exemple, débute par la formation de microagrégats, abolie par la déplétion de p62, (Guilbert et al. 2018). Par ailleurs, la fonction de p62 dans la régulation de l'agrésome pourrait dépendre de son association à la déacétylase atypique HDAC6 (« *Histone deacetylase 6* ») (Yan et al. 2013). En effet, le transport des protéines ubiquitinées vers l'agrésome, qui est proposé faciliter l'agrèphagie en recrutant la machinerie autophagique, nécessite la fonction de la déacétylase HDAC6 (Kawaguchi et al. 2003).

HDAC6 est une déacétylase cytoplasmique unique qui possède un domaine de liaison à l'ubiquitine (BUZ) permettant ainsi la reconnaissance des protéines ubiquitinées. Via la déacétylation d'une de ses cibles majeures, α -tubuline, HDAC6 induit l'agglomération et le transport des protéines, de façon dépendante de la dynéine, afin de former l'agrésome (Kawaguchi et al. 2003). Enfin, HDAC6 est nécessaire pour l'agrèphagie en induisant la fusion autophagosome-lysosome via le recrutement et la déacétylation de cortactine (une ABP) au niveau de l'agrésome périnucléaire (Zhang et al. 2007; Lee et al. 2010). En effet, cortactine déacétylée lie l'actine et favorise son remodelage via le recrutement et l'activation du complexe Arp2/3 qui induit donc la polymérisation de l'actine (Zhang et al. 2007; Uruno et al. 2001; Weaver et al. 2001). Ainsi, l'activité catalytique d'HDAC6 sur cortactine stimule l'assemblage d'un réseau branché de F-actine qui promeut la fusion des autophagosomes avec le lysosome au niveau de l'agrésome (Lee et al. 2010). En conclusion, HDAC6 joue un rôle fondamental dans le système agrésome-lysosome depuis le transport des agrégats à la dégradation des cargos via un remodelage du cytosquelette (tubuline et actine).

Notamment dans le contexte de la voie de l'agrésome, p62 en s'associant de façon directe à HDAC6, modulerait négativement son activité sur cortactine (Yan et al. 2013). Il a été montré que p62 serait nécessaire pour favoriser le remodelage de F-actine dépendant de cortactine dans la région du MTOC. Par ailleurs, il a été reporté de façon indépendante que la phosphorylation de p62 et de HDAC6 par la kinase CK2 (« *Casein Kinase 2* ») favorise la formation et la dégradation de l'agrésome (Matsumoto et al. 2011; Watabe et Nakaki 2011). L'ensemble de ces travaux suggèrent donc un lien fonctionnel important entre p62 et HDAC6 lors de la prise en charge et la séquestration-élimination des protéines poly-ubiquitinées.

1.2.1.4.2. Les « p62 bodies » : des centres organisateurs de la signalisation grâce à leur formation par séparation de phase ?

Les « p62 bodies » ne seraient pas systématiquement précurseurs des vésicules autophagiques : ces derniers sont supposés constituer des structures qui spécifient les différentes fonctions de p62, non seulement dans le CQP mais également dans la signalisation cellulaire. Il est proposé que certaines de ces structures pourraient être réversibles et sont suggérées être des structures de « séquestration » de la signalisation cellulaire (« séquestosomes »), notamment dans la voie de signalisation NF- κ B (Lamark et al. 2003; Bjørkøy et al. 2005; Nakamura et al. 2010; Lin et al. 2013; Ciuffa et al. 2015). En effet, la formation de « p62 bodies » serait requise pour former un « centre » d'organisation de la signalisation.

Dans ce contexte, le domaine PB1 de p62 est nécessaire pour assembler des agrégats cytoplasmiques qui favorisent l'organisation d'un complexe, associé aux agrégats, formé de p62-TRAF6-MEKK3 (« *Mitogen activated protein kinase kinase 3* »). Ce dernier favorise l'ubiquitination du complexe IKK (« *inhibitor of kappa B Kinase* ») par TRAF6 (fonction d'ubiquitine ligase) résultant en l'activation de NF- κ B. Par ailleurs, la formation de ces structures favoriserait la séquestration réversible de protéines clés permettant la reprogrammation et la compartimentation de certaines voies de signalisation dans la cellule (Rantanen et al. 2013; Houslay et Christian 2010). Par exemple, la séquestration de la phosphatase C1-Ten par p62 permettrait son inactivation spécifique requise pour la différenciation musculaire (Koh et al. 2014).

De manière importante, jusqu'à récemment, les « p62 bodies » associés aux protéines poly-ubiquitinées étaient considérés comme des structures non dynamiques. Ces inclusions étaient vues comme un mécanisme permettant la sélection, la concentration et surtout la séparation des cargos

cibles par les récepteurs de l'autophagie assurant leur isolement par la machinerie autophagique (Bjørkøy et al. 2005; Komatsu et al. 2007). Néanmoins, cette vision a considérablement évolué grâce à deux publications (parues en 2018) qui ont révélé que les structures formées par p62 seraient dynamiques et initiées par un processus appelé séparation de phase. En d'autres termes, p62 forme des gouttelettes *in vitro* et *in cellulo* qui possèdent des propriétés similaires à celles d'un liquide, telles qu'une sphéricité élevée et la possibilité de fusionner et/ou fissionner (Sun et al. 2018; Zaffagnini et al. 2018). Les compartiments subcellulaires et les structures stables (nucléoles, granules de stress ou structures mitotiques) sans être liés par des membranes (Li et al. 2012; Woodruff 2018) résultent de réactions de séparation de phases qui aboutissent à la condensation de molécules, telles que des protéines, de l'ARN ou de l'ADN, dans de larges structures (Danieli et Martens 2018). Mécaniquement, la séparation de phase des « *p62 bodies* » dépend de (a) la polymérisation de p62; (b) de son interaction avec les chaînes de poly-ubiquitine, en particulier de K63; (c) de la longueur de la chaîne de poly-ubiquitine où une plus haute efficacité de la séparation de phase a été observée avec des chaînes de poly-ubiquitine plus longues (Sun et al. 2018; Zaffagnini et al. 2018); et (d) de la phosphorylation de p62 (Sun et al. 2018). Il a été suggéré que cette séparation de phase induite par les chaînes de poly-ubiquitine entraînerait ainsi la concentration et la ségrégation des cargos autophagiques favorisant leur dégradation subséquente.

Mais surtout, une des propriétés essentielles des structures cellulaires résultant de la séparation de phase est que les macromolécules concentrées dans ces structures présentent une grande mobilité due au fait que les interactions sont multivalentes et de faible affinité (Danieli et Martens 2018). De manière surprenante, allant à l'encontre de l'idée initiale sur l'inertie des « *p62 bodies* », les analyses *in vitro* des « *p62 bodies* » liés aux chaînes d'ubiquitine par récupération de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) ont permis de déterminer que les substrats ubiquitinés et LC3 présentent une récupération rapide de fluorescence (Sun et al. 2018; Zaffagnini et al. 2018). Ceci indique une forte mobilité du contenu des « *p62 bodies* » ainsi qu'un échange important entre ces structures avec et le cytoplasme environnant. En revanche, la récupération du signal de p62 est faible, mais est rétablie plus rapidement *in vivo* qu'*in vitro* (Sun et al. 2018; Zaffagnini et al. 2018). Ces résultats démontrent une association plus stable aux condensats et indiquent que d'autres facteurs peuvent affecter la fluidité de p62 *in vivo*, où la protéine subit de nombreuses modifications post-traductionnelles. Ainsi, bien que la formation des « *p62 bodies* » dépende de p62 au même titre que l'ubiquitine, ces deux partenaires d'interaction présentent un comportement extrêmement différent au sein des structures. Ces observations ont constitué l'élément clé du changement de

paradigme concernant les « *p62 bodies* », où ces condensats à séparation de phase formés par p62 permettent un échange de leurs composants avec l'environnement.

Ainsi, les « *p62 bodies* », assemblés par séparation de phase, permettraient la formation de complexes multimoléculaires qui échangent des composants avec le milieu environnant, y compris ubiquitine et LC3, et subissent des événements de fusion et/ou de fission avec d'autres « *p62 bodies* ». La membrane autophagosomale se formerait ensuite autour de ces derniers pour englober la cargaison autophagique (Sun et al., 2018; Zaffagnini et al., 2018). Cependant, à l'intérieur d'une gouttelette semblable à un liquide, les molécules devraient conserver leur conformation et leur activité (Sánchez-Martín et Komatsu 2018). Par conséquent, les « *p62 bodies* » pourraient également servir de « plateformes », à partir desquelles des cascades de signalisation pourraient être activées dans le contexte de l'autophagie sélective (Sun et al., 2018). La découverte de cette nouvelle propriété laisse aussi croire que ce mécanisme pourrait être crucial pour la fonction signalétique des « *p62 bodies* » en tant que « centre » d'organisation de la signalisation en favorisant un échange rapide des composants. On peut supposer par exemple, que cet échange rapide pourrait faciliter l'ubiquitination de IKK par TRAF6 « à grande échelle » afin d'induire une activation rapide et efficace de NF- κ B en réponse au stress. D'ailleurs en ligne avec cette possibilité, il est important de rappeler que p62 se lie plus fortement aux chaînes d'ubiquitines liées à K63, qui peuvent être une marque associée à des fonctions non protéolytiques (section 1.2.1.3.1; Long et al. 2008; Komander et Rape 2012; Wurzer et al. 2015). De plus, des analyses par reconstitution *in vitro* indiquent que diverses liaisons de chaîne d'ubiquitine, mais particulièrement K63, sont capables de favoriser la formation des « *p62 bodies* » par séparation de phase tandis que les monoubiquitines libres ou les chaînes d'ubiquitine non ancrées à un substrat, en particulier la liaison K48, inhibent la formation « *p62 bodies* » (Zaffagnini et al., 2018).

Les études *in vitro* et *in cellulo* décrites précédemment ont donc révélé que l'unique présence de substrats ubiquitinés est suffisante pour initier la formation des « *p62 bodies* » (Sun et al., 2018; Zaffagnini et al., 2018). Dans des conditions où une augmentation de la quantité d'ubiquitine est observée dans des cellules, il a été montré que p62 est elle-même ubiquitinée sur le domaine UBA pour favoriser la reconnaissance des cargos poly-ubiquitinés, favorisant ainsi le flux autophagique (Peng et al. 2017). Ensembles, ces études suggèrent donc que p62 serait « sensible » aux variations des niveaux des substrats ubiquitinés et « répondrait » à ses variations par la formation des « *p62 bodies* ». Notamment, en réponse à divers facteurs de stress, l'expression de p62 est stimulée, sa localisation peut être modifiée et son activité est contrôlée par des modifications post-

traductionnelles telle que la phosphorylation. La régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de la protéine feront donc l'objet du prochain paragraphe.

1.2.1.4.3. Régulation de p62 et pathologies associées.

Concernant sa régulation transcriptionnelle, l'inflammation et le stress oxydatif, qui activent respectivement NF- κ B et Nrf2, induisent la transcription du gène p62 (Ishii et al. 2000; Jain et al. 2010; Taniguchi et al. 2016). En contrepartie, ces deux facteurs de transcription sont tous deux activés par p62, établissant ainsi deux boucles de rétroaction positives imbriquées (Taniguchi et al. 2016). Il est à noter que p62 active la voie non canonique de Nrf2 (Komatsu et al. 2010; Lau et al. 2010).

Le niveau protéique de p62 est majoritairement régulé par une dégradation rapide et continue par autophagie à un niveau basal. Par conséquent, une diminution de l'autophagie s'accompagne généralement d'une accumulation massive de p62, suivie de la formation caractéristique d'agrégats contenant p62 et des protéines ubiquitinées (Komatsu et al. 2007; Komatsu Masaaki et Ichimura Yoshinobu 2010; Rogov et al. 2014; Levine et Kroemer 2008). Ces structures agrégées ont d'ailleurs été identifiées dans les tissus de patients, notamment en association avec des maladies neurodégénératives et des cancers (Stumptner et al. 1999; Kuusisto, Salminen, et Alafuzoff 2001; Zatloukal et al. 2002; Tan et al. 2008; Kurosawa et al. 2016). Notamment, il est suggéré que l'inhibition de l'autophagie est un mécanisme de régulation positive des niveaux de p62, couramment observée dans les tumeurs humaines, et qui contribue directement à la tumorigénèse (Mathew et al. 2009). L'augmentation des niveaux de p62 engendre probablement des perturbations de la fonction adaptatrice de p62 dans la transduction des signaux de voies de contrôle essentielles à l'oncogénèse. Par exemple, une expression soutenue de p62 serait suffisante pour modifier la régulation de NF- κ B et l'expression de ses gènes cibles ce qui favoriserait la tumorigénèse (Mathew et al. 2009). Il est suggéré que le ciblage à la voie de dégradation autophagique médiée par p62 pourrait représenter une stratégie prometteuse pour les interventions cliniques dans différents cas de cancer. Il est important de souligner que tant la surexpression que la sous expression de p62 sont corrélées à de nombreux types de cancer chez l'homme (Taniguchi et al. 2016). En outre, sa sous expression dans le stroma de plusieurs cancers, notamment le cancer de la prostate, le cancer du sein et le cancer du côlon, favorise l'inflammation et la tumorigénèse (Valencia et al. 2014). De surcroît, p62 a également été impliquée dans la progression mitotique (Linares et al. 2011).

En conclusion, un gain ou une perte de p62 peut favoriser la tumorigénèse pouvant s'expliquer par le fait que cette protéine est multifonctionnelle. Cependant, une meilleure compréhension de la régulation et de la contribution des différentes fonctions de p62 dans la tumorigénèse, c'est-à-dire signalisation versus contrôle de qualité des protéines, est requise.

Les fonctions de p62 sont modulées par des modifications post-traductionnelles incluant la phosphorylation, qui est la voie de régulation la mieux décrite (Sánchez-Martín et Komatsu 2018). La phosphorylation de p62, régulée par plusieurs voies de signalisation, est essentielle pour contrôler son assemblage moléculaire ainsi que pour favoriser la liaison et la séquestration des protéines ubiquitinées, incluant des substrats à dégrader et des protéines de signalisation (résumé fig. 1. 11).

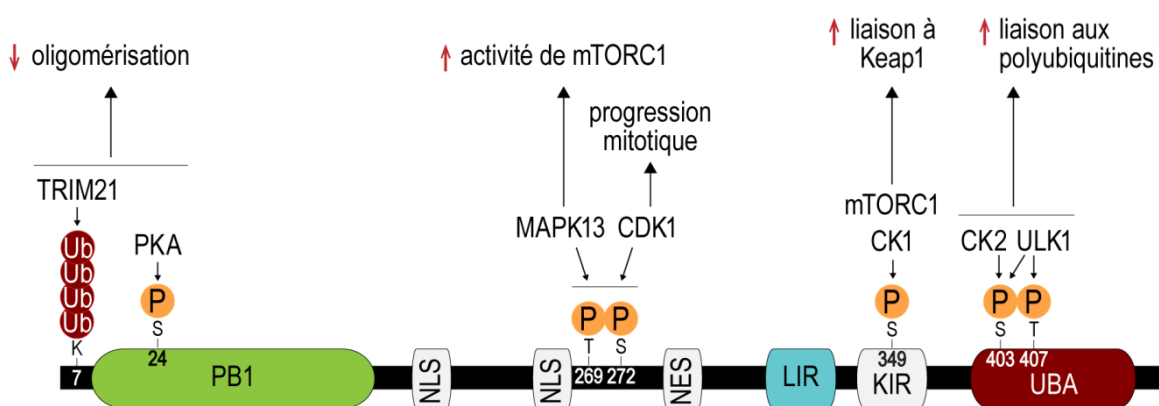


Figure 1.11: Principales modifications post-traductionnelles de p62 essentielles pour la régulation de ses fonctions (Sánchez-Martín et Komatsu 2018). L'ubiquitination du résidu K7 par TRIM21 (« *TRIPartite Motif-containing protein 21* ») (Pan et al. 2016) et la phosphorylation du résidu S24 par PKA (« *Protein Kinase A* ») (Christian et al. 2014) inhibent l'oligomérisation. La phosphorylation de T269 et S272 est impliquée dans de l'autophagie dépendante de mTORC1 (Linares et al. 2015) ou dans la progression de la mitose (Linares et al. 2011), en fonction de la kinase responsable de la modification c'est-à-dire MAPK13 (« *Mitogen Activated Protein Kinase 13* » ou p38δ) et CDK1 (« *Cyclin Dependent Kinase 1* »), respectivement. L'interaction avec Keap1 est renforcée par la phosphorylation de S349 par mTORC1 ou CK1 (« *casein kinase 1* » ; Ichimura et al. 2013; Watanabe et al. 2016). La reconnaissance du substrat par le domaine UBA est améliorée par la phosphorylation de S403 par ULK1 ou CK2 (Matsumoto et al. 2011) ainsi que par la phosphorylation de S407 par ULK1; Lim et al. 2015).

Par exemple, la phosphorylation de p62 sur la sérine 349 en réponse aux stimuli autophagiques (mTORC1, CK1 ; Ichimura et al. 2013; Watanabe et al. 2016) régulerait sa fonction de séquestration dans la voie non canonique d'activation de Nrf2 (Komatsu et al. 2010; Lau et al. 2010). En effet, la phosphorylation de S349 favoriserait la liaison à l'ubiquitine ligase de Nrf2 Keap1, sa séquestration dans les *p62 bodies* et sa dégradation par autophagie (Sánchez-Martín et Komatsu 2018). Ce processus inhiberait alors l'ubiquitination de Nrf2 par Keap1, empêchant la

dégradation du facteur de transcription. La stabilisation et l'activation de Nrf2 enclenchent l'expression de ses gènes cibles, incluant p62. Puisque p62 est elle-même dégradée en même temps que les substrats autophagiques, cette boucle de rétrocontrôle positif maintient alors un flux autophagique par l'induction de la synthèse de p62. La régulation de la phosphorylation de p62 impacte ainsi sur la régulation de sa transcription, et en bout de ligne joue un rôle important pour la fonction autophagique de la protéine.

L'autre fonction majeure de la phosphorylation de p62 est d'augmenter sa sélectivité avec les protéines ubiquitinées afin de les éliminer par autophagie. C'est le cas par exemple de la phosphorylation directe de S403 par CK2, dans le domaine UBA de p62, qui augmente l'affinité entre le domaine UBA et la chaîne de poly-ubiquitine (Matsumoto et al. 2011). Ce mécanisme permettrait le ciblage efficace des protéines poly-ubiquitinées dans les « séquestosomes » et de favoriser leur dégradation, suggéré par le fait que la surexpression de CK2 ou l'inhibition de la phosphatase réduit la formation de corps d'inclusion de protéines ubiquitinées d'une manière dépendante de p62 (Matsumoto et al. 2011). Par ailleurs, S349 est phosphorylée par CK1 lors d'une accumulation de protéines endommagées et l'inhibition de cette phosphorylation empêche la formation d'inclusion de protéines ubiquitinées et la co-localisation de p62 avec des protéines à tendance à l'agrégation comme α -synucléine, associée par exemple à la maladie de Parkinson (Watanabe et al. 2016). Cette étude a mis en évidence que S349 et S403 sont phosphorylées de manière dépendante de HSF1 (« *Heat Shock transcription Factor 1* »). HSF1 est un facteur de transcription et régulateur principal du réseau de la protéostasie via l'induction de l'expression de multiples HSP, dont les HSPB, et de régulateurs des HSP, dont le co-chaperon BAG3 (Watanabe et al. 2016). Ceci suggère donc un couplage entre la régulation de p62, les chaperons et co-chaperons moléculaires par HSF1. En outre, il a été montré que l'inhibition de HSF1 diminue la formation d'autophagosomes (Watanabe et al. 2016). Ceci met en évidence un rôle important des modifications post-traductionnelles de p62 dans la voie agrésome-autophagie, dans la reconnaissance des substrats et leur triage vers dégradation. De surcroît, le couplage de sa régulation par phosphorylation et l'induction de l'expression des chaperons par HSF1, suggère un lien intéressant quant à la régulation de la formation des « *p62 bodies* » et du processus d'autophagie sélective. D'ailleurs, une étude récente du laboratoire suggère que la formation des « *p62 bodies* » lors d'un stress protéotoxique nécessiterait l'intervention des systèmes chaperons, en l'occurrence le complexe BAG3-HSPB8 (Guilbert et al. 2018) et sera discutée dans la prochaine section.

En conclusion, p62 est une protéine d'échafaudage multifonctionnelle dont de nombreux rôles ne sont plus à démontrer, comme son action dans l'autophagie sélective. Il est clair également que la formation des « *p62 bodies* » constitue le cœur du mode d'action et de la régulation de ses fonctions. Cependant, son rôle de senseur d'ubiquitine en lien avec sa fonction de « séquestration » signalétique demeure peu connu. De surcroît, le changement de paradigme concernant la formation des « *p62 bodies* » par séparation de phase ouvre de nouvelles pistes de recherches fascinantes.

Dans la prochaine section seront présentées les observations qui ont identifié une implication du CQP dans la modulation de structures à base d'actine dans différents contextes cellulaires.

1.2.2. Exemples de diverses implications du contrôle de qualité des protéines dans la dynamique et l'organisation cytosquelette d'actine.

Dans les paragraphes 1.1 et 1.2, nous avons donc discuté et mis en avant que pour répondre de façon appropriée aux stimuli de son environnement, une cellule a besoin d'assembler et de désassembler des complexes de signalisation tout comme des structures polymériques du cytosquelette d'actine. Concernant la signalisation, p62 est un bel exemple d'acteur de la protéostasie pouvant agir comme modulateur signalétique en favorisant l'assemblage spatio-temporel de complexes protéiques. Dans cette section, nous discuterons des implications du CQP dans la régulation des structures multi-protéiques nécessaires à la dynamique adéquate et à l'intégrité du cytosquelette d'actine, particulièrement dans des conditions où ce dernier subit des contraintes mécaniques.

Les acteurs du CQP relatifs à l'intégrité du cytosquelette d'actine sont multiples. Par exemple, il est connu que la chaperonine cytosolique TriC/CCT, ci-après nommée CCT (« *chaperonin containing TCP-1* »), qui est un chaperon moléculaire, assure le repliement de nombreuses protéines nouvellement synthétisées dont actine, lui conférant une fonction cruciale dans l'organisation du cytosquelette (Brackley et Grantham 2009). CCT, en collaboration entre autres avec HSP70, est aussi impliquée dans la maturation de myosine II musculaire (repliement de la chaîne motrice, liaison à l'actine, assemblage..) (Lee, Melkani, et Bernstein 2014). En l'occurrence, le repliement de myosine II est catalysé par les HSP 90 et 70 qui sont assistées par UNC-45, qui appartient à une famille de chaperons de myosines (Barral et al. 2002; Lee, Melkani, et Bernstein 2014). UNC-45 est aussi requis pour l'assemblage des filaments de myosine II et son incorporation au sein du sarcomère pendant le développement du muscle ou dans l'anneau contractile en cytokinèse (Barral

et al. 2002). Enfin, dans les muscles matures, le renouvellement de myosine II suite aux dommages générés par les forces de traction, est géré par les chaperons moléculaires HSP90, HSP70 et UNC-45 (Barral et al. 2002; Lee, Melkani, et Bernstein 2014). Enfin, UNC-45 favorise la génération des fibres de stress, en synchronisant le repliement de myosine II non musculaire et l'assemblage des filaments (Lehtimäki et al. 2017).

Dans les muscles squelettiques et cardiaques, qui sont des organes dynamiques s'adaptant constamment aux sollicitations mécaniques et aux changements métaboliques, il a été montré que l'élimination des protéines et des organelles endommagées, par le protéasome et l'autophagie, est essentielle pour assurer l'intégrité de la masse musculaire (Sandri 2010; Masiero et Sandri 2010; Sandri et al. 2013). Ceci illustre le fait que le CQP et par conséquent, ses acteurs, jouent un rôle crucial et interviennent dans le maintien de l'intégrité des structures du d'actine soumises à des tensions mécaniques. Notamment, il a été montré que filamine est dénaturée par la tension mécanique, tant dans les cellules musculaires squelettiques que les cellules musculaires lisses, et est dégradée par autophagie sélective. *Ce processus met en jeu le complexe BAG3-HSPB8-HSP70-p62 et sera abordé à la section 1.3.4.1.*

La migration des cellules nécessite des cycles rapides d'assemblage/désassemblage des FA, donc de leur renouvellement, au front de migration des cellules. D'ailleurs, les FA dirigent en partie la migration en générant des forces mécaniques pour le mouvement. L'assemblage des FA permet aux cellules d'établir une traction pour le mouvement vers l'avant, tandis que leur désassemblage ultérieur permet un déplacement efficace de la cellule (Kenific et al. 2016). En outre, nous avons mentionné que les FA sont des structures macromoléculaires gigantesques (section 1.1.2.2). Pour assurer la dynamique d'assemblage et de désassemblage de cette structure complexe, il ne serait pas surprenant que le CQP intervienne, puisque ses acteurs peuvent faciliter ce processus. De façon importante, au cours des cinq dernières années, un nombre grandissant d'études ont rapporté que l'autophagie sélective dépendante de p62 et NRB1 est impliquée dans des processus cellulaires requérant une haute dynamique des structures d'actine telles que la migration cellulaire et le renouvellement des adhésions focales (Galavotti et al. 2013; Tuloup-Minguez et al. 2013; Belaid, Cerezo, et al. 2013; Palumbo et al. 2014; Zhan et al. 2014; Catalano et al. 2015; Sharifi et al. 2016; Kenific et al. 2016; Chen et al. 2018; Fontana et Vivo 2018).

L'inhibition de l'autophagie sélective, dépendante de NRB1, aurait pour conséquence de diminuer la migration des cellules et de perturber le renouvellement des FA. En outre, des cellules dont

l'autophagie est déficiente, par la déplétion de protéines ATG par exemple, présentent une diminution de leur migration corrélée à une augmentation de la taille des FA, suggérant un défaut de leur désassemblage (Kenific et al. 2016; Sharifi et al. 2016). De plus, il a été observé une augmentation du nombre d'autophagosomes aux sites des FA au front de migration des cellules (Sharifi et al. 2016). L'autophagie sélective faciliterait donc le renouvellement des FA au front de migration des cellules pendant la migration. Il a également été suggéré que l'autophagie sélective dépendante de p62 serait essentielle au contrôle de la voie RhoA et à la migration cellulaire subséquente (Belaid, Cerezo, et al. 2013). En effet, l'autophagie dépendante de p62 serait nécessaire pour maintenir une quantité appropriée de RhoA au niveau des lamellipodes pour assurer la motilité cellulaire. En fait, l'activation de l'autophagie favoriserait une migration cellulaire rapide par la séquestration RhoA alors que le blocage de la formation de l'autophagosome ou de la séquestration de RhoA aurait les effets opposés (déplétion de ATG7 ou p62). Le modèle proposé dans l'étude est que la séquestration de RhoA actif dans les vésicules autophagiques et sa dégradation limiteraient le niveau de RhoA actif présent au niveau de la membrane plasmique au front de migration des cellules (Belaid, Cerezo, et al. 2013). Par conséquent, des altérations de la voie de l'autophagie peuvent avoir un impact important sur la motilité cellulaire.

Sur la base des exemples décrits ici, il apparaît que les acteurs du CQP jouent donc un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du cytosquelette d'actine et également dans le remodelage de ces structures et des adhésomes lors de processus dynamiques, tel que la migration cellulaire. Toutefois, peu d'informations sont à ce jour disponibles concernant les mécanismes de spécificité de ciblage qui permettent la reconnaissance des substrats à dégrader, et qui pourraient faire intervenir la fonction de complexes chaperons spécifiques. D'autre part, une fonction claire des chaperons dans le processus d'assemblage et de désassemblage des structures à base d'actine demeure encore peu connue. Des évidences récentes suggèrent néanmoins l'implication du co-chaperon BAG3 dans différents modèles qui impliquent une régulation dynamique des structures à base d'actine et leur intégrité. Dans la prochaine section seront présentées les évidences grandissantes qui ont identifié BAG3 et HSPB8 dans ces processus dans différents contextes cellulaires, qu'ils soient physiologiques ou pathologiques.

1.3. BAG3 et HSPB8 : émergence d'une fonction de ce complexe dans la supervision de l'architecture et du remodelage du cytosquelette d'actine ?

1.3.1. HSPB8 : une HSPB atypique au sein de sa famille de chaperons moléculaires.

HSPB8 a été initialement identifiée comme une protéine kinase (H11) dans des cellules de mélanome (Smith et al. 2000). En revanche, devant la faible homologie avec des protéines kinases, du faible taux d'autophosphorylation et de l'absence de substrat spécifique, l'activité kinase de la protéine a été remise en question et a finalement été attribuée à une contamination de kinases associées au chaperon (Kim 2004). HSPB8 a été rapidement décrite par la suite comme un chaperon moléculaire de la famille HSPB (Kappé et al. 2001). Tout comme les autres membres de sa famille, HSPB8 prévient l'agrégation de protéines dénaturées *in vitro* et présente une activité chaperon *in vivo* (Chowdary et al. 2004; Carra et al. 2005; Mannini et al. 2012), bien que cette activité semble plus limitée que celle du prototype de cette famille HSPB1 (Carra et al. 2005).

Chez l'humain, HSPB8 est une petite protéine de choc thermique de 22 kDa (HSP22) dont l'expression est ubiquitaire dans une grande variété de tissus et est abondante dans les muscles squelettiques et lisses, le cœur et le cerveau (Kappé et al. 2001). L'expression de HSPB8 est régulée pendant le développement et semble être impliquée dans des processus cellulaires fondamentaux comme la différenciation ou la prolifération. En outre, chez le porc, l'expression de HSPB8 au cours du développement varie et chaque tissu semble avoir un profil unique d'expression où une augmentation du niveau protéique a été observée dans les muscles, l'estomac, le foie, les poumons, les reins tandis que celui-ci est constant dans le cœur (Verschuure 2003). HSPB8 est également fortement exprimée pendant la neurogénèse de l'hippocampe chez le rat *in vivo* et pendant la différenciation des cellules neurales *in vitro* (Ramírez-Rodríguez et al. 2013). Il a aussi été suggéré que l'expression de HSPB8 est requise pour la croissance cellulaire des kératinocytes (Aurelian 2001). HSPB8 présente également un effet sur la survie cellulaire, en inhibant l'apoptose ou en facilitant la prolifération cellulaire (Acunzo 2012; Piccolella et al. 2017). Comme mentionné précédemment, dans des cardiomyocytes soumis à des contractions forcées, HSPB8 jouerait un rôle de modulateur du cytosquelette d'actine en régulant les niveaux d'activation de RhoA (Ke et al. 2011).

Dans des contextes pathologiques, la surexpression de HSPB8 a été associée à la progression et la résistance des cellules tumorales, ainsi qu'à la prolifération et à la migration des cellules (Yu et al.

2001; Li et al. 2014; Suzuki et al. 2015; Hamouda et al. 2014; Piccolella et al. 2017; Mariko Suzuki et al. 2015; Matsushima-Nishiwaki et al. 2017; Piccolella, Crippa, Cristofani, Rusmini, Galbiati, Cicardi, Meroni, Ferri, Morelli, Carra, Messi, et Poletti 2017). L'induction robuste de l'expression de HSPB8 en réponse à l'accumulation de protéines dénaturées dans les neurones moteurs et les muscles peut protéger contre une toxicité induite par les protéines mal repliées (Carra et al. 2013; Crippa et al. 2013; Rusmini et al. 2015). Ainsi, en corrélation avec cette fonction, et au vu de son niveau protéique élevé dans les muscles et le cerveau, il n'est pas surprenant que des mutations de HSPB8 (entre autres les mutations K141E et K141N situées dans le domaine α -cristallin de la protéine) ont été associées au développement de maladies neurologiques et de myopathies sévères (Irobi et al. 2004; Tang et al. 2005; Wilhelmus et al. 2006; Kim et al. 2006; Hu et al. 2007). Par exemple, la mutation du chaperon dans un modèle murin induit un dysfonctionnement des muscles squelettiques et cardiaques associé à une déstabilisation du disque Z (Sanbe et al. 2013; Bouhy et al. 2018).

Ces études mettent en avant que HSPB8 est associée à divers processus physiologiques ou pathologiques qui nécessitent, à l'instar de la famille des HSPB, une haute dynamique du cytosquelette d'actine.

Plusieurs éléments font de ce chaperon un membre atypique au sein des HSPB. Déjà, il a récemment été suggéré que *l'activité chaperon de HSPB8* serait moins efficace en comparaison des HSPB oligomériques, et *serait plus spécifique du substrat* (Mymrikov et al. 2017). Mais surtout, bien qu'une interaction entre HSPB8 avec d'autres HSPB ait été décrite, cette interaction dans les cellules ainsi que la formation de larges oligomères de HSPB8 n'ont pas été clairement démontrées (Sun et al. 2004; Fontaine et al. 2005; Mymrikov et al. 2012). De surcroît, contrairement aux autres membres de sa famille, HSPB8 n'arbore pas de motif IXI/V, normalement essentiel à l'oligomérisation (Kappé et al. 2001; Carra et al. 2008; Studer et al. 2002; Delbecq, Jehle, et Klevit 2012; Delbecq et Klevit 2013). Ceci suggère un autre mode de régulation de l'activité du chaperon. C'est l'équipe du Dr Landry qui a démontré par des essais de co-sédimentation que HSPB8 est principalement retrouvée sous forme de dimères stables en association avec le co-chaperon moléculaire BAG3 (Carra et al. 2008b).

Ainsi, il a été démontré que la stabilité et la plupart des fonctions de HSPB8 dépendent de BAG3. En effet, suite à la déplétion du co-chaperon BAG3 dans les cellules HeLa (cellules cancéreuses humaines du col de l'utérus), le niveau protéique de HSPB8 est diminué en condition basale (Carra

et al. 2008). Deux motifs IPV (Isoleucine-Proline-Valine) ont été identifiés dans la séquence protéique de BAG3 qui sont essentiels pour assurer l'interaction avec HSPB8, laquelle est proposée mimer possiblement l'interaction qui se produit normalement entre les motifs IXI/V présents dans les HSPB (Fuchs et al. 2010). De plus, Fuchs et al. ont montré que les motifs IPV de BAG3 sont essentiels au maintien de l'activité chaperonne de HSPB8 (Fuchs et al. 2010). Ceci pourrait en partie expliquer que le mode d'action de HSPB8 soit distinct par rapport aux HSPB oligomériques : tandis que HSPB1, HSPB5 et HSPB6 pourraient agir principalement comme des réservoirs stockant des protéines mal repliées jusqu'à ce qu'elles soient traitées par des chaperons ATP-dépendants (Bakthisaran et al., 2015), HSPB8, pourrait agir de manière plus sélective, via son association avec le co-chaperon BAG3. Toutefois, lors de l'inhibition du protéasome, les travaux du laboratoire (Guilbert et al. 2018) ont mis en évidence que les niveaux protéiques de HSPB8 dans ces conditions restent stables même dans des cellules déplétées en BAG3 (Guilbert et al. 2018). Ces résultats suggèrent donc que HSPB8 pourrait avoir une fonction indépendante de BAG3 en condition de stress protéotoxique. Le mécanisme moléculaire qui assure la stabilité de HSPB8 en absence de BAG3 dans ces conditions reste à déterminer.

Il a été rapporté que HSPB8 peut être phosphorylée *in vitro* par différentes kinases telles que PKC (protéine kinase C), MAPK (« *mitogen-activated protein kinase* »), ERK1 (« *p44 mitogen-activated protein kinase* ») et la protéine kinase dépendantes de l'AMPc (Benndorf et al. 2001; Shemetov et al. 2008; Shemetov, Seit-Nebi, et Gusev 2011). Des données protéomiques, disponibles sur le site *phosphosite.org*, indiquent également que HSPB8 peut être phosphorylée *in vivo* sur de multiples sites. Le rôle de ces phosphorylations demeure cependant encore élitif. D'une part, le mime de la phosphorylation des sérines S24 et S27, cibles de ERK1, diminue l'activité chaperon de la protéine (Shemetov, Seit-Nebi, et Gusev 2011), suggérant que même si HSPB8 ne forme pas de larges homo- ou hétéro-oligomères avec les autres HSPB, le mode de régulation par phosphorylation semblerait être conservé. D'autre part, la mutation du résidu T87 de HSPB8 augmente son activité chaperon (Shemetov, Seit-Nebi, et Gusev 2011). Puisque les sites de phosphorylation sont principalement situés à l'extrémité N-terminale, et que celle-ci est supposée être impliquée dans la liaison des substrats de HSPB8 (Shemetov et al. 2008), les phosphorylations sur différents sites pourraient probablement affecter les propriétés de liaison de HSPB8 avec ses substrats. Ceci serait en corrélation avec le fait que son activité chaperon serait plus spécifique du substrat que les autres membres de la famille HSPB.

À l'inverse, l'expression de BAG3 est peu affectée par la déplétion de HSPB8 en condition basale tout comme en condition de stress protéotoxique. De plus, en condition d'inhibition du protéasome, l'interaction de BAG3 avec HSPB8 est dispensable pour l'activité de BAG3 dans le transport des micro-agrégats vers l'agrésome. Mais curieusement, nous avons constaté que la stabilité et la fonction de BAG3 est dépendante de son association à HSPB8 pendant la division cellulaire (Fuchs et al. 2015; Varlet et al. 2017). Ces observations mettent en évidence que la relation BAG3-HSPB8 est complexe et semblerait dépendre du contexte cellulaire. BAG3 possède donc des fonctions dépendantes et indépendantes de la liaison à HSPB8. Ceci pourrait potentiellement s'expliquer grâce au fait que BAG3 est une protéine d'échafaudage possédant de nombreux modules d'interaction protéiques, et est suggérée être une plateforme d'intégration de multiples réseaux signalétiques. Le prochain paragraphe présentera en détail le co-chaperon moléculaire BAG3.

1.3.2. Généralités sur le co-chaperon moléculaire BAG3.

BAG3 appartient à la famille des « protéines B cell lymphoma 2 (Bcl-2)-associated athanogene » (BAG) qui comprend six membres (BAG1 à 6) possédant tous un domaine BAG conservé dans leur région C-terminale (excepté BAG5 qui en possède quatre). Les protéines BAG sont des co-chaperons moléculaires pour les HSP70 (entre autres HSC70 [« *Heat Shock Cognate of 70 kDa* »] et HSP70, forme constitutive et inductible respectivement)(Takayama, Xie, et Reed 1999). La conservation évolutive de ces protéines à domaine BAG (et homologues), depuis la levure jusqu'à l'humain, et même chez les plantes, pointe vers un rôle biologique central dans la physiologie cellulaire. Une caractéristique commune des protéines BAG est leur activité générale de promotion de la survie cellulaire dans des conditions de stress (similaire à Bcl-2)(Behl 2016).

Ces protéines jouent un rôle important de facteur d'échanges nucléotidiques modulant ainsi l'activité des HSP70. Le domaine BAG lie le domaine de liaison aux nucléotides des membres de la famille HSP70 favorisant la libération de l'ADP du chaperon pour faciliter le cycle nucléotidique (Rauch et Gestwicki 2014). Grâce à la diversité de leur extrémité N-terminale, les co-chaperons moléculaires de cette famille modifient, assemblent et confèrent une spécificité de substrats pour les HSP70 (localisation, machinerie de dégradation...), déterminant ainsi le devenir des clients du chaperon. Par exemple, via son domaine UBL (« *ubiquitin-like* »), BAG1 s'associe aux substrats de HSP70 et les dirige vers la voie de dégradation par le protéasome (Lüders, Demand, et Höhfeld 2000). En contraste, en association avec BAG3, ceux-ci sont plutôt dirigés vers l'autophagie sélective (Ulbricht, Arndt, et Höhfeld 2013). Il est à noter que la liaison de BAG3 à HSP70 est plus

forte qu'avec BAG1 ou BAG2 (Rauch et Gestwicki 2014). BAG3 est donc considérée comme le facteur d'échange nucléotidique le plus puissant de HSP70, suggérant qu'elle est un partenaire fonctionnel important pour le chaperon.

BAG3 a été découverte en premier lieu comme co-chaperon de HSC/HSP70 (Takayama, Xie, et Reed 1999). Cependant, deux autres groupes l'ont identifiée en parallèle : 1) en tant qu'interacteur de Bcl-2 qui agit en synergie avec ce dernier afin de prévenir l'apoptose, BAG3 a ainsi été nommée « *Bcl-2 interacting death suppressor* » (ou BIS) (Lee et al. 1999) ; et 2) comme une protéine dont l'expression est induite dans des cellules de mélanome humain en réponse à un stress, en outre par exposition au CAI (un inhibiteur de canaux calciques non voltage-dépendants) et de ce fait nommée CAI stress response-1 (CAIR-1) (Doong et al. 2000).

1.3.2.1.Expression de BAG3 : de la physiologie aux pathologies.

Chez l'humain, BAG3 est une protéine généralement cytoplasmique de 575 acides aminés (75 kDa) exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme, mais à différents degrés selon les tissus (Doong et al. 2000). Notamment, l'expression basale de BAG3 est faible dans la majorité des tissus sains et jeunes, excepté dans les cellules musculaires (cardiaques et squelettiques) et neuronales où son expression est constitutivement élevée (Homma et al. 2006; Gamerdinger et al. 2009). D'ailleurs, BAG3 s'exprime de façon différentielle au cours du développement, et est impliquée dans le développement des cellules gliales et neuronales du système nerveux central (Choi et al. 2006, 2009; Gentilella et Khalili 2010). De plus, les niveaux d'expression de l'ARNm et protéique de BAG3 augmentent progressivement au cours de la myogenèse squelettique (Hong et al. 2016). Il est à noter que son expression peut être augmentée en réponse à un stress cellulaire par le facteur de transcription HSF1 ce qui souligne l'importance du co-chaperon dans la régulation de processus de protection cellulaire (Franceschelli et al. 2008; Du et al. 2009; Jung et al. 2010).

Le co-chaperon joue un rôle dans la différenciation des neurones et des cellules musculaires cardiaques ainsi que dans la migration neuronale (Santoro et al. 2017; Marco, Turco, et Rosati 2011). Ainsi, de par son rôle cyto-protecteur lié à sa fonction autophagique et son expression préférentielle et élevée dans ces tissus, une dérégulation ou des mutations de BAG3 sont associées à de nombreuses pathologies musculaires et neurodégénératives liées à l'âge (Stürner et Behl 2017). Par ailleurs, des souris homozygotes déficientes pour le gène de BAG3 développent des myopathies sévères postnatales et meurent quatre semaines après la naissance (Homma et al. 2006). Chez

l'humain, une mutation hétérozygote de BAG3 (Pro209Leu) provoque le développement d'une sévère dystrophie musculaire infantile associée avec une cardiomyopathie et une sévère insuffisance respiratoire (Selcen et al. 2008). Cette mutation a aussi été associée à une neuropathie axonale (Odgerel et al. 2010). Les myopathies relatives à BAG3 sont sévères et associées à une faiblesse musculaire générale, des cardiomyopathies, des neuropathies et une mortalité précoce (Ruparelia et al. 2014; Semmler et al. 2014; Konersman et al. 2015; Knezevic et al. 2015; Kostera-Pruszczyk et al. 2015; Fang et al. 2017; Myers et al. 2018). D'autre part, BAG3 est associée à des maladies conformationnelles, telles que les maladies d'Huntington, d'Alzheimer et de Parkinson. Ces maladies sont caractérisées par une accumulation aberrante de protéines dans des inclusions cellulaires insolubles, et sont corrélées aux potentielles fonctions autophagiques de BAG3 (Carra, Seguin, et Landry 2008; Gamerding et al. 2009, 2011; Xu et al. 2013; Minoia et al. 2014).

Par ailleurs, de nombreuses études ont apporté des évidences que BAG3 est surexprimée dans de multiples lignées cancéreuses d'origine épithéliale, spécialement dans les adénocarcinomes (carcinomes hépatique, pancréatique, thyroïdien, mammaire ou prostatique, des mélanomes, des cancers rénaux, colorectaux, ovariens et du col utérin) ainsi que des ostéosarcomes, des leucémies lymphoïdes ou myéloïdes, des lymphomes, des myélomes, des neuroblastomes, ou encore des glioblastomes (Rosati et al. 2011; Kassis et al. 2006; Iwasaki et al. 2007; Xiao et al. 2014; Meng et al. 2014; Shi et al. 2016; Song et al. 2017). En outre, BAG3 a été associée à de multiples processus cellulaires contribuant à la progression tumorale et nécessitant un remodelage du cytosquelette d'actine comme l'EMT (Li et al. 2013; Xiao et al. 2014; Meng et al. 2014; Song et al. 2017), l'invasion, l'adhésion ou encore la motilité cellulaire (Iwasaki et al. 2007, 2010; Kassis et al. 2006; Suzuki et al. 2011; Shi et al. 2016) et la division cellulaire (Fuchs et al. 2015; Varlet et al. 2017).

Le point majeur ressortant de ces études est que le contrôle du niveau d'expression de BAG3 semble primordial puisqu'une surexpression comme une diminution des niveaux protéiques de BAG3 induit une dérégulation de nombreux processus cellulaires. Ainsi, l'effet pléiotropique de BAG3, s'exprimant par la diversité des processus cellulaires perturbés, suggère que cette dernière serait impliquée dans différents réseaux de signalisation cellulaire. Il est important de souligner que BAG3, en dehors de son implication dans l'autophagie sélective, possède également, comme mentionné ci-dessus, des fonctions anti-apoptotiques, dans le développement et la différenciation cellulaire ainsi que dans des processus cellulaires qui reposent sur une régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine et une haute dynamique de celui-ci. En l'occurrence, cette multifonctionnalité de BAG3 lui serait conférée par la présence de différents modules d'interaction

protéine-protéine qui font d'elle une plateforme d'échafaudage s'associant ainsi avec de nombreux partenaires. Les prochaines sections viseront donc à présenter les domaines d'interactions protéiques de ce co-chaperon et à donner une vue d'ensemble des évidences qui ont permis de proposer un modèle où BAG3 serait une plateforme signalétique complexe, capable de coupler des réseaux de signalisation diversifiés au CQP.

1.3.2.2. BAG3, une protéine d'échafaudage possédant de multiples domaines et motifs d'interaction protéine-protéine.

Le co-chaperon BAG3 s'associe avec deux systèmes chaperons différents via différents domaines d'interaction. Notamment, il est seul membre connu des protéines à domaine BAG capable d'une telle fonction. BAG3 interagit donc avec HSP70 ainsi qu'avec les HSPB et particulièrement avec HSPB8, spécifiant ainsi leur fonction. En effet, grâce à ses motifs IPV (présentés dans la section 1.2.1.2.), BAG3 interagit particulièrement avec le chaperon HSPB8, et avec une plus affinité aux chaperons HSPB1, HSPB2, HSPB5, HSPB6 (Rauch et al. 2017). Ainsi, l'interaction BAG3-HSPB8 est clairement préférentielle (Fuchs et al. 2010; Rauch et al. 2017; Morelli et al. 2017). L'étude de Rauch et al. a également montré que BAG3 pouvait lier en même temps HSP70 et HSPB1, HSPB5 et HSPB8 et que BAG3 coordonne HSPB1 et HSP70 pour favoriser la renaturation de luciférase dénaturée *in vitro*. Ces résultats ont donc permis de mettre l'accent sur BAG3 en tant que protéine d'échafaudage capable de coupler physiquement et fonctionnellement HSP70 et les HSPB (Rauch et al. 2017). Il est important de souligner ici que BAG3 apparaît comme un co-chaperon préférentiel tant pour HSP70 que pour HSPB8. De plus, BAG3 est particulière au sein de sa famille car elle est la seule protéine BAG à posséder deux domaines de signalisation : les domaines PxxP et WW (Behl 2016). Ensemble, ces éléments laissent penser que BAG3 pourrait intégrer le contrôle de qualité à des processus cellulaires clés et reliés à la modulation du cytosquelette (fig. 1.12).

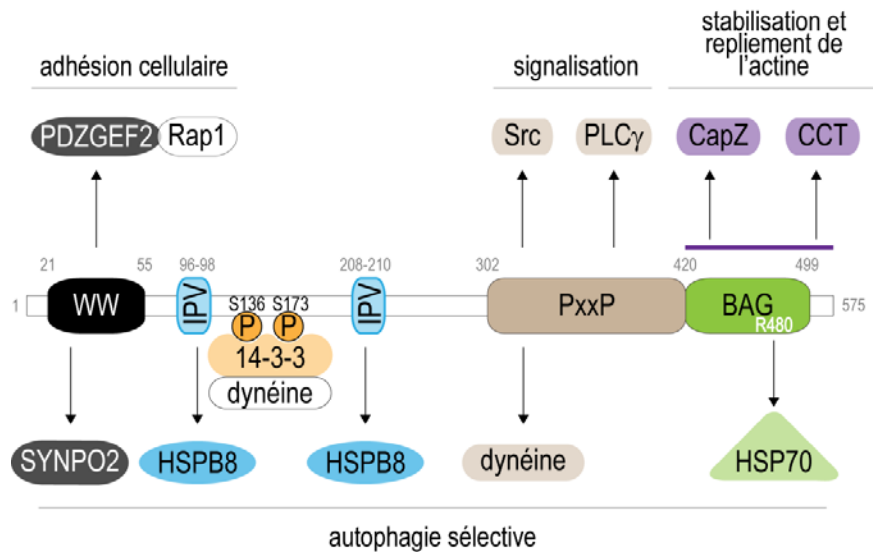


Figure 1.12: Structure de BAG3 et partenaires d'interaction (Guilbert et al, 2015). Les multiples domaines de BAG3 lui confèrent des fonctions signalétiques, en lien avec la dynamique du cytosquelette d'actine (SYNPO2, PDZGEF2, Src, CapZ, CCT) et une implication dans l'autophagie sélective.

En effet, la région N-terminale de BAG3 est caractérisée par la présence d'un domaine WW (Takayama, Xie, et Reed 1999) qui correspond à un module d'interaction protéique qui lie des motifs riche en proline, PPxY (Sudol et Hunter 2000). Certains domaines WW reconnaissent leurs ligands peptidiques d'une manière dépendante de la phosphorylation conférant au domaine WW un statut équivalent à celui des domaines SH2 et SH3 (« *Src Homology 2 ou 3* », Sudol et Hunter 2000). Les domaines WW ont été fréquemment identifiés dans les protéines structurales et de signalisation impliquées dans de nombreux processus cellulaires incluant la modulation des cytosquelettes (Salah, Alian, et Aqeilan 2012). Ainsi, la présence d'un domaine WW suggère bien une potentielle fonction signalétique de BAG3 en lien potentiellement avec une fonction modulatrice du cytosquelette d'actine. En amont du domaine BAG est retrouvé le domaine PxxP qui est composé de plusieurs répétitions de motif PxxP (motif riche en proline) qui sont caractérisés pour interagir avec des protéines à domaine SH3 (Kurochkina et Guha 2012). Les protéines à domaine SH3 sont importantes pour réguler des interactions protéine-protéine dans les voies de transduction du signal et dans la signalisation cytoplasmique. Entre autres, les domaines SH3 sont présents dans les protéines des voies de signalisation régulant le cytosquelette d'actine, comme les protéines kinase de la famille Src, ou alors myosine et cortactine (Kurochkina et Guha 2012). Ceci suggère que BAG3 pourrait potentiellement cibler les deux systèmes chaperons, HSC/HSP70 et HSPB, sur des protéines spécifiques impliquées dans la régulation du cytosquelette.

Par ailleurs, un autre facteur illustre l'idée que BAG3 serait une plateforme d'interaction et signalétique importante: le nombre élevé d'interacteurs différents de BAG3 déjà identifiés. Ceci suggère que BAG3 aurait un impact régulateur déterminant sur de nombreux processus biologiques importants. Par exemple, une analyse de l'interactome de BAG3 dans des cellules HeLa a identifié près de 400 partenaires d'interaction putatifs (protéines du cytosquelette, des chaperons, des facteurs de transcription, des molécules de signalisation...) impliqués dans des voies de signalisation diverses et variées, incluant l'autophagie, la migration, la prolifération, l'adhésion, la modulation du cytosquelette, la régulation du cycle cellulaire et l'apoptose (Chen et al. 2013). De surcroît, un nombre croissant d'évidences suggère que BAG3 est phosphorylée sur des résidus différents et dans différents contextes cellulaires (Li et al. 2013; Xu et al. 2013; Iorio et al. 2015; Fuchs et al. 2015; Kim et al. 2016 ; *Phosphositesplus.org*). Cette modulation par phosphorylation pourrait également contribuer à la fonction de BAG3 en tant que plateforme d'interaction et de signalisation puisque la phosphorylation module de nombreuses interactions protéine-protéine. Nous allons donc nous intéresser dans la prochaine section aux fonctions de BAG3 en tant que plateforme signalétique qui participerait à la modulation de structures à base d'actine dans différents contextes cellulaires.

1.3.2.3. Modulation de BAG3 par phosphorylation : un mécanisme de régulation de la protéine encore peu étudié.

Un an après sa découverte, une première étude a montré que BAG3 est phosphorylée de manière dépendante de l'activité des protéines kinases C (PKC) dans des extraits cellulaires de mélanome humain et de cancer du sein (Doong et al. 2000). BAG3 est également phosphorylée sur des résidus tyrosine après stimulation des cellules à l'EGF (Doong et al. 2000). De façon surprenante, ce n'est que treize ans plus tard que BAG3 a été identifiée comme une cible de PKC δ , qui phosphoryle BAG3 sur la serine 187 (fig. 1.13), dans des cellules cancéreuses thyroïdiennes (N. Li et al. 2013). Cette phosphorylation a été impliquée dans l'induction de l'EMT et dans le processus d'invasion de ces cellules. Par ailleurs, BAG3 interagit avec la protéine 14-3-3 de façon dépendante de la phosphorylation des résidus S136 et S173 de BAG3 qui sont situés dans la région entre les deux motifs IPV (fig. 1.13). En outre, 14-3-3 sert d'adaptateur moléculaire régulant l'interaction entre BAG3 et dynéine, et contribue ainsi au ciblage des protéines dénaturées à l'agrésome (mécanisme décrit paragraphe 1.3.3.2, Xu et al. 2013). Il a également été montré que dans des cellules pancréatiques, suite à une stimulation au glucose, BAG3 est phosphorylée sur tyrosines de manière dépendante de FAK (« *Focal Adhesion kinase* ») facilitant ainsi la relâche du glucose (Iorio et al.

2015). Une étude récente a aussi mis en évidence qu'en réponse à un stress oxydant, BAG3 est phosphorylée sur T285 et S289 de façon dépendante de l'activité des kinases ERK pour favoriser la survie cellulaire via la translocation nucléaire du facteur de transcription HSF1 (fig. 1.13; Kim et al. 2016). BAG3 est donc la cible de multiples kinases en réponse à différents stimuli mais une analyse fonctionnelle de ces modifications post-traductionnelles est jusqu'ici manquante.

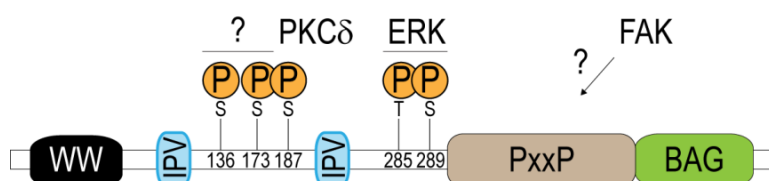


Figure 1.13: Sites de phosphorylation de BAG3 et les kinases associées.

Les travaux de Fuchs et al. (annexe 1), ont démontré que BAG3 est hyperphosphorylée à l'entrée des cellules en mitose mais ni la kinase, ni le rôle de ces phosphorylations n'ont été identifiés. En revanche, comme mentionné au préalable, nous avons mis en évidence que la stabilité des niveaux BAG3 pendant la mitose, donc lorsqu'elle est phosphorylée, est dépendante de son association à HSPB8. De plus, la phosphorylation en elle-même est stabilisée par HSPB8. Pour finir, la fonction mitotique de BAG3 est dépendante de son association à HSPB8. Ensemble, ces éléments laissent entendre que la phosphorylation mitotique de BAG3 pourrait contribuer à son action mitotique. *Les chapitres 2 et 3 de cette thèse s'intéresseront de ce fait à la modulation des fonctions de BAG3 par sa phosphorylation mitotique.*

1.3.2.4. BAG3 : une plateforme signalétique modulant potentiellement l'activité de différentes enzymes et couplant l'association à leurs substrats ?

Bien que cette fonction de BAG3 n'ait pas été établie clairement, plusieurs études pointent vers un rôle de BAG3 comme protéine d'échafaudage couplant la modulation de l'activité enzymatique de différentes protéines avec leurs substrats. Corroborant cette idée, l'analyse bioinformatique de l'interactome de BAG3, réalisée par Chen et al, a mis en évidence que parmi les interacteurs de BAG3, les plus représentés présentaient une activité enzymatique (protéases, transférases, ligases, peptidases...)(Chen et al. 2013). D'autres études, avec des évidences biochimiques et/ou fonctionnelles, corréleront ces observations et seront décrites dans cette section.

Une étude a montré que BAG3 interagit avec Src par son domaine PxxP et faciliter par son association à HSP70 (Colvin et al. 2014). Celle-ci suggère que l'interaction BAG3-HSP70 serait requise pour moduler des voies de signalisation pro-tumorales telles que les voies NF- κ B ou Src. En fait, la déplétion de HSP70 induit l'activation de Src qui se traduit par une augmentation de la phosphorylation activatrice de la kinase ainsi que de ses cibles paxilline et p130Cas, deux protéines régulant l'organisation du cytosquelette d'actine et l'adhérence cellulaire. De façon surprenante, la déplétion de BAG3 seule n'induit pas l'activation de Src, par contre, elle prévient l'activation de la kinase dans les cellules déplétées en HSP70. Ces résultats suggèrent qu'HSP70 module négativement l'activité de Src et que cette fonction du chaperon nécessite son association avec BAG3. De manière importante, ceci suggère aussi que BAG3 pourrait servir de plateforme signalétique capable de coupler les fonctions de HSP70 avec des voies de signalisation, dans un contexte de lignées cellulaires cancéreuses. Cette étude a mis pour la première fois en lumière un rôle clair de BAG3 en tant que plateforme de signalisation, en corrélation directe avec son rôle de co-chaperon de HSP70. Bien qu'il n'en soit pas discuté dans le papier, la déplétion de BAG3 induit une diminution de la phosphorylation des cibles de Src. BAG3 régulerait-il positivement l'activité de Src?

D'autre part, il a été montré que BAG3, dans une lignée d'ostéosarcome humain, module l'apoptose entre autres, via l'activité du facteur de transcription NF- κ B qui régule l'expression de protéines anti-apoptotiques. Dans ce contexte, BAG3 soutient l'activation de NF- κ B par la régulation négative de l'interaction entre HSP70 et IKK γ , protégeant de ce fait IKK γ de la dégradation protéasomale dépendante de HSP70 (Ammirante et al. 2010; Yunoki et al. 2015). Dans les cellules endothéliales, BAG3 favorise l'association entre la protéine kinase ERK et sa phosphatase DUSP6 (« *Dual Specificity Phosphatase 6* »). Ceci a pour conséquence de diminuer la phosphorylation et donc l'activité de ERK conduisant à une modulation négative de l'angiogénèse (Falco et al. 2012; Yunoki et al. 2015). Par ailleurs, BAG3 module positivement l'activité GTPase de Rac1 et interagit avec RAPGEF6 (« *Rap Guanine nucleotide Exchange Factor 6* »), un activateur de la GTPase Rap1 suggérant donc une potentielle modulation de son activité GTPase également (Iwasaki et al. 2007, 2010). Dans un contexte de lignée de carcinome mammaire, la phosphorylation de FAK est modulée par BAG3 de façon dépendante de son domaine PxxP et de la kinase Src (Kassis et al. 2006). Ces études associent BAG3 à la dynamique du cytosquelette d'actine, entre autres dans les processus d'adhésion, de motilité et de migration cellulaire.

Ensemble, ces évidences suggèrent que BAG3 serait une plateforme d'interaction favorisant ou empêchant l'association entre des protéines possédant une activité enzymatique et leurs substrats. Cette fonction serait en ligne avec le rôle des chaperons et des co-chaperons dans l'assemblage/désassemblage de complexes protéiques. Bien que son rôle en tant que plateforme de signalisation soit peu étudié, il apparaît que ses différents domaines et motifs d'interactions protéine-protéine font de BAG3 une plateforme d'interaction importante, permettant entre autres de relier le système chaperon HSP70 et des réseaux de signalisation complexes notamment ceux qui contrôlent l'organisation du cytosquelette. **Néanmoins, aucune étude à notre connaissance n'a démontré un lien entre l'activité signalétique de BAG3 et son rôle de co-chaperon de HSPB8.** Et pour cause, les fonctions du complexe BAG3-HSPB8 ont majoritairement été caractérisées dans le contexte de stress protéotoxique où l'activité de ce dernier est requise pour le ciblage sélectif des protéines à la machinerie autophagique ou leur séquestration à l'agrésome, dont le mécanisme moléculaire sera décrit dans la section ci-après (1.3.3). De plus, jusqu'à nos travaux publiés en 2015, la fonction de BAG3 était associée à son interaction avec HSP70. **Nous sommes donc les premiers à avoir identifiée une fonction de BAG3 indépendante de HSP70 mais dépendante de HSPB8, dans la division cellulaire des cellules cancéreuses (section 1.4.4. et Fuchs et al. 2015, annexe 1). Les travaux de cette thèse s'intéresseront donc au rôle fonctionnel de BAG3 en tant que plateforme signalétique en relation avec sa fonction de co-chaperon de HSPB8 (chapitre 4 et annexe 2).**

1.3.3. Le complexe chaperon BAG3-HSPB8 dans le processus d'autophagie sélective.

La sélection des protéines endommagées peut être assistée par des chaperons et co-chaperons moléculaires, qui coopèrent avec la machinerie autophagique (Kettern et al. 2010; Bandyopadhyay et al. 2010; Ulbricht et Höhfeld 2013; Behl 2016). Le co-chaperon BAG3 exerce une fonction centrale dans la médiation de l'induction et de l'accomplissement de l'autophagie sélective des agrégats protéiques (Behl 2011, 2016). BAG3 est également impliquée dans une des voies de la formation de l'agrésome (Gamerding et al. 2011). Notamment, BAG3 est un adaptateur sélectif de la voie agrésome-autophagie, mais ne possède pas de domaine LIR (motif d'association à LC3), ni de domaine d'interaction à l'ubiquitine : elle exécute sa fonction en interagissant avec les chaperons moléculaires HSC/HSP70 et HSPB8 et avec p62.

1.3.3.1. Induction de l'autophagie sélective par le complexe BAG3-HSPB8.

La première étude à suggérer l'implication de ce complexe dans l'induction de la voie autophagique a été menée par l'équipe du Dr J. Landry (Carra et al. 2008b). Après avoir initialement démontré qu'une surexpression de HSPB8 prévient l'accumulation de protéines à tendance à l'agrégation (forme pathogénique de la protéine Huntingtin, Htt43Q, qui s'agrège spontanément ; Carra, Sivilotti, Zobel, et al. 2005), l'équipe a rapporté que la formation d'un complexe stable BAG3-HSPB8 est essentielle pour l'activité du chaperon. En outre, une surexpression de BAG3 stimule la dégradation de Htt43Q, tandis que sa déplétion par siARN empêche cette dégradation induite par HSPB8 au même titre que l'inhibition de l'autophagie (Carra et al. 2008b). Ensemble, ces résultats suggéraient que le complexe BAG3-HSPB8 pouvait stimuler la dégradation de protéines agrégées par la voie autophagique.

S'en est suivi plusieurs études qui ont confirmé cette fonction de BAG3. Par exemple, il a été montré que la surexpression de BAG3 faciliterait la séquestration des substrats de HSP70 dans des « *p62 bodies* », co-distribuant avec LC3, ce qui favoriserait le ciblage des substrats de HSP70 vers la dégradation autophagique (fig. 1.14 ; Minoia et al. 2014). L'ubiquitination des substrats de HSC/HSP70 s'effectuerait par CHIP, une ubiquitine ligase associée à HSC70 qui mène à l'ubiquitination de protéines reconnues par ces chaperons (Stankiewicz et al. 2010; Meacham et al. 2001; Gamerding, Carra, et Behl 2011). Bien que ces observations suggèrent une implication de BAG3 dans la modulation de l'autophagie sélective, le mécanisme moléculaire précis par lequel BAG3 agit dans cette voie est encore peu connue à l'heure actuelle.

Récemment, les travaux du laboratoire ont démontré pour la première fois que lors de l'inhibition du protéasome, qui induit un stress protéotoxique, HSPB8 contribue à l'agrégation contrôlée des protéines ubiquitinées via la modulation de l'assemblage moléculaire des « *p62 bodies* », en amont de leur transport vers l'agrésome (fig. 1.14 et 1.15; Guilbert et al. 2018). En outre, HSPB8 et BAG3 maintiennent les niveaux d'expression de p62 ainsi que de sa phosphorylation sur S349 lors de l'inhibition du protéasome. Puisque la phosphorylation de S349 régule la voie Keap1-Nrf2, en corrélation avec ces observations, les niveaux de Nrf2 sont aussi régulés par BAG3 et HSPB8. De manière importante, la codistribution induite par le stress des « *p62 bodies* » avec Keap1 est abrogée suivant la déplétion de HSPB8 ou BAG3 (Guilbert et al. 2018). Ensemble, ces résultats ont ainsi permis de découvrir que HSPB8, en association avec BAG3, jouerait un rôle central dans

l'assemblage des « *p62 bodies* » coordonnant la séquestration des protéines ubiquitinées avec une réponse cytoprotectrice via Nrf2.

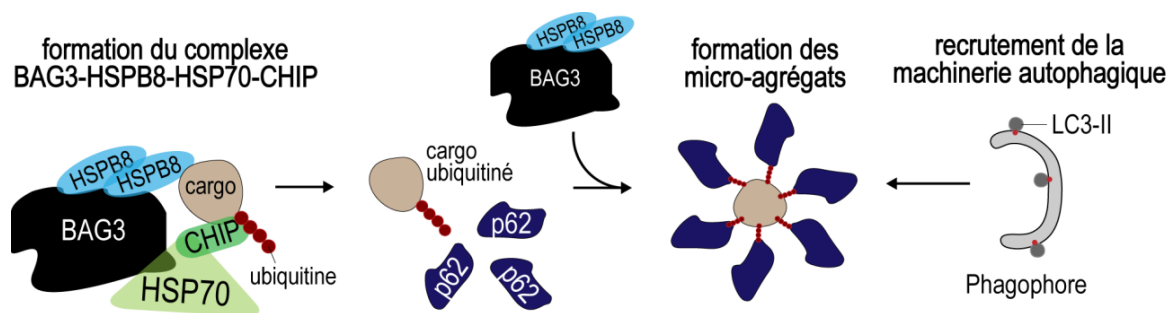


Figure 1.14 : Modèle du mécanisme par lequel BAG3-HSPB8 aiderait au ciblage de protéines poly-ubiquitinées à la machinerie autophagique.

1.3.3.2. Implication du complexe BAG3-HSPB8 dans le ciblage des protéines ubiquitinées à l'agrésome.

BAG3 serait un acteur clé du ciblage des micro-agrégats de protéines poly-ubiquitinées à l'agrésome : la déplétion de BAG3 conduit, en effet, à une diminution du transport des micro-agrégats et par conséquent à une diminution de la formation de l'agrésome (Gamerdinger et al. 2011; Watanabe et al. 2016; Guilbert et al. 2018). Pour rappel, l'agrésome est une structure péricentrosomale formée par l'agrégation de micro-agrégats, présentant un enrichissement de systèmes chaperons et machinerie protéasomale et autophagique. Il est suggéré constituer un centre de stockage facilitant la dégradation et donc l'élimination des protéines contenues dans les micro-agrégats. Le modèle actuel est que HSPB8, en plus de favoriser la formation des « *p62 bodies* », faciliterait leur couplage à BAG3 en condition d'inhibition du protéasome (Guilbert et al. 2018). Ensuite, BAG3 faciliterait le transport actif et le ciblage à l'agrésome des « *p62 bodies* » et/ou des substrats ubiquitinés de HSP70, en stimulant leur transfert au complexe moteur dynéine (fig. 1.15; Gamerdinger et al. 2009, 2011; Arndt et al. 2010; Ulbricht, Arndt, et Höhfeld 2013; Xu et al. 2013; Minoia et al. 2014; Guilbert et al. 2018). L'association de BAG3 avec dynéine pourrait s'effectuer soit de façon directe via le domaine PxxP de BAG3 (Gamerdinger et al. 2011); soit indirectement via l'association à la protéine adaptatrice 14-3-3 et de façon dépendante de la phosphorylation des résidus S136 et S173 de BAG3 (Xu et al. 2013). Dans notre étude, la formation de l'agrésome dépendrait de la phosphorylation de BAG3 sur ces sites mais pas de son domaine de signalisation PxxP (fig. 1.15; Guilbert et al. 2018). Ceci suggère que dans notre modèle, la délétion du domaine PxxP et donc la perte d'interaction à la dynéine pourrait être compensée par l'interaction 14-3-3-

dynéine. Enfin, la présence de p62 à l'agrésome est présumée favoriser le recrutement de phagophores, conduisant à la reconnaissance des cargos par l'autophagosome et stimulant ainsi l'agrégation (Gamerding et al. 2009, 2011; Arndt et al. 2010; Matsumoto et al. 2011; Ulbricht et Höhfeld 2013; Lin et al. 2013; Lim et al. 2015).

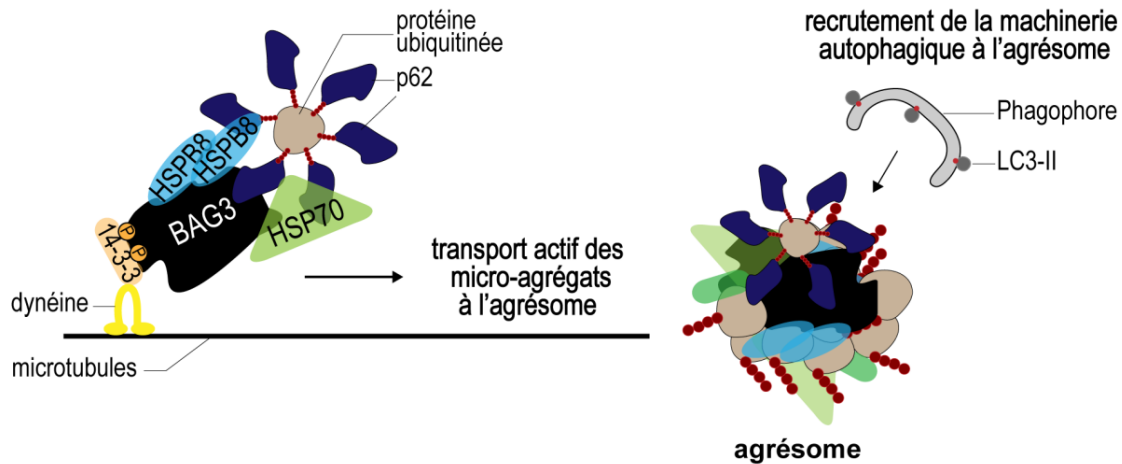


Figure 1.15 : Modèle de formation de l'agrésome dépendante de BAG3. HSPB8 coopère avec BAG3 pour coordonner la séquestration de protéines ubiquitinées et la réponse adaptative cellulaire lors de l'inhibition du protéasome dépendante de la formation des « *p62 bodies* ».

De manière importante, l'autophagie sélective et le complexe BAG3-p62-HSC70-HSPB8 sont requis pour l'intégrité des structures à base d'actine dans les cellules musculaires, mécanisme qui sera décrit en détail dans le prochain paragraphe (1.3.4.1). La prochaine section présentera également les observations qui ont identifié une implication du complexe chaperon BAG3-HSPB8 dans la modulation de du cytosquelette d'actine dans différents contextes cellulaires.

1.3.4. Le contrôle de qualité des protéines du cytosquelette d'actine par BAG3.

1.3.4.1. L'autophagie induite par la tension mécanique : BAG3 coordonne l'autophagie sélective assistée par les chaperons (CASA).

De façon importante, l'équipe du Dr. Höhfeld a identifié le mécanisme de CASA comme étant essentiel pour le maintien de l'intégrité de l'architecture du cytosquelette d'actine dans les cellules musculaires et du muscle dans son intégralité. Les auteurs ont également mis en évidence que la CASA est conservée de la drosophile à l'homme où l'autophagie sélective médiée par le complexe BAG3-p62-HSC70-HSPB8 est requise pour le maintien de l'intégrité du disque Z et donc de la

stabilité des myofibrilles lorsque les cellules musculaires sont soumises à des tensions mécaniques (Arndt et al. 2010; Ulbricht et al. 2013; Kathage et al. 2017).

BAG3 faciliterait la formation d'un complexe constitué de HSPB8, p62, HSC70 et de l'ubiquitine ligase CHIP au niveau du disque Z (Arndt et al. 2010; Ulbricht et al. 2013). CHIP a été identifiée comme constituant de ce complexe et son association au complexe est favorisée par HSC70 dans les cellules musculaires squelettiques (Arndt et al. 2010; Ulbricht et al. 2013). Ceci est suggéré conduire au recrutement de p62 permettant la séquestration des protéines ubiquitinées dans les « *p62 bodies* » et faciliter de ce fait la formation des autophagosomes (Gamerding et al. 2009, 2011; Arndt et al. 2010; Ulbricht et Höhfeld 2013; Guilbert et al. 2018). Les déterminants moléculaires responsables du recrutement de p62 au complexe demeurent imprécis cependant. Dans ce modèle, il est également présumé que HSPB8 aiderait à la reconnaissance de la filamine dénaturée par les contraintes mécaniques, mais une telle fonction reste à être démontrée clairement. Par ailleurs, sur la base de nos récents travaux, on peut penser que la fonction de HSPB8 interviendrait en amont de BAG3-HSC70 dans la régulation de la formation des « *p62 bodies* » et que la machinerie de la CASA pourrait plutôt être recrutée par HSPB8 via BAG3 (Guilbert et al. 2018). Quoi qu'il en soit, la formation de ce complexe multi-chaperon induit la dégradation par autophagie sélective de filamine endommagée par les tensions mécaniques induites par la contraction musculaire.

À travers son association à SYNPO2, BAG3 favoriserait la formation de l'autophagosome puisque SYNPO2 assurerait la liaison entre BAG3 et une machinerie de fusion des membranes essentielles pour la formation de l'autophagosome (Ulbricht et al. 2013). Par ailleurs, le domaine WW de BAG3 est suggéré assurer également l'interaction avec des inhibiteurs (LATS1 [« *Large Tumor Suppressor Kinase 1* »], AMOTL1 et AMOTL2 [« *Angiomotin-like protein* » 1 ou 2]) des co-activateurs de facteurs de transcription YAP/TAZ (« *Yes-Associated Protein* »)/TAZ (« *Tafazzin* »). Ceci a été corrélé avec la translocation de YAP/TAZ au noyau et la transcription de filamine en réponse aux tensions mécaniques. Un tel mécanisme moléculaire contribuerait donc à l'homéostasie des cellules musculaires en dirigeant d'une part l'élimination de filamine dénaturée par les tensions mécaniques, et d'autre part, son renouvellement via la transcription dépendante de YAP/TAZ (Ulbricht et al. 2013). Il n'est donc pas surprenant que l'altération de la CASA soit corrélée avec une désintégration du disque Z et une faiblesse musculaire progressive chez les mouches, les souris et les hommes, suggérant que ce mécanisme est important pour la maintenance des structures cellulaires à base d'actine (Arndt et al. 2010; Ulbricht et al. 2013). Ces études ont

donc fait la preuve de concept que la dégradation de filamine par la CASA contribue à la mécanotransduction dans les cellules musculaires.

Récemment, le même groupe a mis en évidence dans des cellules musculaires lisses soumises à des contraintes mécaniques que BAG3, via son implication dans la CASA, initie l'autophagie sélective aux niveaux des fibres de stress, où est observée une dénaturation de filamine, en favorisant l'inhibition locale de mTORC1 (Kathage et al. 2017). Ce mécanisme est facilité par l'interaction de BAG3, via son domaine WW, avec TSC1 (« *Tuberous Sclerosis protein 1* ») qui forme un complexe inhibiteur de mTORC1 en association à TSC2 (« *Tuberous Sclerosis protein 2* »). Cette association entraînerait le recrutement du complexe inhibiteur TSC aux sites de dénaturation de filamine où il agirait sur une sous-population de vésicules mTOR positives associées au cytosquelette d'actine. De façon concomitante, la séquestration de TSC1/TSC2 par BAG3 lèverait l'inhibition de mTORC1 dans le reste de la cellule, et stimulerait de ce fait la synthèse protéique. Cette étude suggère alors que la régulation spatiale de mTORC1 exercée par BAG3 pourrait coordonner une induction simultanée de l'autophagie et de la synthèse protéique dans le but de maintenir un protéome intact, et en l'occurrence assurer l'intégrité des protéines du cytosquelette lorsque les cellules subissent des contraintes mécaniques.

En conclusion, ces études suggèrent que BAG3 et ses partenaires autophagiques sont impliqués dans un mécanisme sélectif de contrôle de qualité des protéines du cytosquelette d'actine induit par la tension mécanique dans les cellules musculaires, assurant simultanément la dégradation autophagique de substrats spécifiques et stimulant leur synthèse *de novo*. La CASA serait ainsi un mécanisme moléculaire impliqué dans la mécanotransduction dans les cellules musculaires et jouerait donc un rôle important dans le maintien de l'intégrité et de l'organisation des structures à base d'actine.

1.3.4.2. Importance fonctionnelle de BAG3 dans la modulation de structures cellulaires à base d'actine.

1.3.4.2.1. Influence sur la polymérisation et la dynamique de l'actine.

De manière importante, il a été montré que le chaperon CCT est également associé à BAG3 (Fontanella et al. 2010). En effet, une étude a mis en évidence que BAG3 influence la disponibilité des monomères d'actine correctement conformés, en association avec CCT (Fontanella et al. 2010).

Cette interaction est favorisée par le domaine BAG de BAG3 suggérant une potentielle implication de l'association entre BAG3 et HSP70. En outre, dans des cellules pancréatiques saines, la déplétion de BAG3 induit une perturbation de la polymérisation de la F-actine, traduit par une sécrétion plus élevée d'insuline par ces cellules (Iorio et al. 2015). En effet, la stimulation des cellules pancréatiques au glucose conduit à une libération d'insuline par exocytose, processus nécessitant la phosphorylation de FAK et induisant la dépolymérisation de la F-actine au site de sécrétion (Rondas, Tomas, et Halban 2011; Kalwat et Thurmond 2013). Or, il a été montré qu'au cours de ce processus, BAG3 est phosphorylée de manière dépendante de FAK (Iorio et al. 2015) suggérant que la phosphorylation de BAG3 pourrait potentiellement contribuer à sa fonction sur le remodelage du cytosquelette d'actine.

Finalement, une étude suggère que BAG3 pourrait favoriser la dé-oligomérisation des larges oligomères de HSPB1 (Rauch et al. 2017). Cette observation ouvre les portes sur un potentiel mécanisme de modulation de l'actine par BAG3 encore inconnu : puisque la dé-oligomérisation sous forme de dimères de HSPB1 favorise la libération des monomères d'actine participant ainsi à la dynamique du cytosquelette (Guilbert, Varlet et al, 2015). Il serait donc concevable que BAG3 puisse favoriser ce processus via son association à HSPB1.

1.3.4.2.2. Adhésion, migration et motilité.

Pour rappel, BAG3 possède un domaine WW et des motifs PxxP (fig. 1.12). Comme décrit précédemment, les domaines WW ont été fréquemment identifiés dans les protéines structurales et de signalisation impliquées dans de nombreux processus cellulaires incluant la modulation des cytosquelettes. Les motifs PxxP eux, sont caractérisés pour interagir avec des protéines à domaine SH3 présents dans les protéines des voies de signalisation, régulant entre autres le cytosquelette d'actine, et dont l'importance fonctionnelle n'est plus à démontrer dans la régulation des voies de transduction du signal et dans la signalisation cytoplasmique.

Une étude a montré que synaptopodine 2 (SYNPO2 ou myopodine), une protéine de réticulation des filaments d'actine qui interagit avec filamine et α -actinine dans les cellules musculaires, s'associe à BAG3 via son domaine WW (Linnemann et al. 2013; Ulbricht et al. 2013). En outre, SYNPO2 induirait l'assemblage de faisceaux d'actine périphériques et d'adhésions focales immatures pour favoriser la formation de lamellipodes et la migration des cellules cancéreuses prostatiques (Kai et

al. 2015). Cependant, une fonction pour cette interaction BAG3-SYNPO2 dans la modulation du cytosquelette d'actine n'a pas été explorée.

Néanmoins, une fonction plus concrète de BAG3 via son domaine WW dans la modulation du cytosquelette d'actine a été reportée dans l'étude d'Iwasaki et al. 2010. En effet, par l'intermédiaire de son domaine WW, BAG3 s'associe directement avec PDZGEF2 (ou RAPGEF6) ce qui module l'adhésion cellulaire (Iwasaki et al. 2010). PDZGEF2 (facteur d'échange de nucléotides guanyliques = « *Guanine Exchange Factor* » ou GEF) est un activateur de la petite GTPase Rap1 qui permet la modulation du remodelage du cytosquelette d'actine principalement en relation avec l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines (Caron 2003). Notamment, des cellules exprimant une protéine mutante de BAG3 dépourvue du domaine WW, adhèrent moins et perdent leur mobilité, suggérant que le domaine WW est important pour l'adhésion cellulaire médiée par les intégrines.

D'autre part, il a été suggéré que BAG3 module l'adhésion et la migration en diminuant l'activité des protéines des FA (Kassis et al. 2006). En effet, dans des cellules de carcinome mammaire, il semble que la surexpression de BAG3 sauvage (WT) ou d'une protéine BAG3 mutante dépourvue du domaine PxxP (Δ PxxP) diminuerait ou augmenterait respectivement, l'adhésion ainsi que la migration des cellules. Dans les cellules surexprimant BAG3 (Δ PxxP), une légère augmentation de la quantité de FA a été observée ; cependant, il a principalement été rapporté une redistribution de celles-ci en périphérie des cellules. D'ailleurs, ceci a été corrélé avec une réorganisation de l'actine : une augmentation du nombre de fibres de stress et de l'épaisseur des filipodes a été observée dans ces cellules. Enfin, une augmentation du niveau de phosphorylation de FAK et de paxilline a également été notée (en ligne avec un renouvellement et une redistribution des FA). Ensemble, ces résultats suggèrent que BAG3 pourrait réguler négativement l'activité de FAK et impacter de ce fait sur la dynamique d'adhérence cellulaire, c'est-à-dire sur l'assemblage et le désassemblage des adhésions focales et la migration via son domaine PxxP (Kassis et al. 2006).

Les travaux d'Iwasaki et al, ont montré à l'inverse qu'une surexpression de BAG3 augmente la motilité cellulaire et que la réduction des niveaux protéiques de BAG3 dans différentes lignées cancéreuses épithéliales induit une diminution de l'adhésion, de la motilité cellulaire et de la capacité d'invasion (Iwasaki et al. 2007). Ceci est associé à une diminution de l'activité de Rac1, suggérant donc que BAG3 pourrait réguler l'activité de Rac1. D'ailleurs, BAG3 est enrichie au front de migration des cellules et co-distribue partiellement avec l'actine dans le lamellipode. Ce

résultat suggère que BAG3 serait recrutée dans des structures cellulaires dans lesquelles sont requises une haute dynamique d'actine, en l'occurrence une polymérisation d'actine active et la nucléation branchée par Arp2/3, ainsi que l'induction de l'autophagie (Lee et al. 2010). Enfin, *in vivo*, une réduction de BAG3 dans des xénogreffes diminue la croissance des tumeurs, l'invasion et la formation de métastases. Ainsi, les hauts niveaux protéiques de BAG3 dans les cellules cancéreuses épithéliales pourraient être pertinents pour favoriser les mécanismes d'invasion tumorale et de métastases (Iwasaki et al. 2007).

Par la suite, il a été montré qu'une diminution de BAG3 dans des cellules thyroïdiennes cancéreuses induit une augmentation de la migration et de l'invasion cellulaire (Meng et al. 2014) ainsi que de l'EMT, processus par lequel les caractéristiques des cellules épithéliales sont perdues en faveur d'un phénotype mésenchymateux. Les cellules tumorales détournent ce mécanisme normalement crucial au moment du développement embryonnaire afin d'envahir les tissus avoisinants (Yeung et Yang 2017). Une marque bien établie de l'EMT est la réduction ou la perte de l'expression de E-cadhérine (Schmalhofer, Brabletz, et Brabletz 2009). Entre autres, le facteur de transcription ZEB1 (« *Zinc finger E-box-binding homeobox 1* »), qui est un répresseur direct de la transcription de E-cadhérine, est l'un des inducteurs clés de l'EMT dont la surexpression est associée à la tumorigénèse et à la formation de métastases des carcinomes (Schmalhofer, Brabletz, et Brabletz 2009). Or, la diminution de BAG3 induit l'augmentation de l'expression de ZEB1, et donc une diminution de E-cadhérine, induisant de ce fait l'EMT (Meng et al. 2014). Ces résultats suggèrent que BAG3 est un régulateur de l'expression de ZEB1 dans le processus d'EMT et de ce fait un régulateur de la formation de métastases dans le cas d'un cancer thyroïdien. Un fait intéressant à noter est que plusieurs études ont aussi établies un lien entre l'autophagie et l'EMT (Pang 2016; Zsiros 2017; Dower et al. 2018).

En contraste, d'autres études ont mis en évidence qu'une diminution de l'expression de BAG3 dans des lignées ou tissus dont l'expression basale de BAG3 est élevée (hépatocarcinomes humains (Xiao et al. 2014), cancers colorectaux humains (Shi et al. 2016) et cancers du col utérin (Song et al. 2017), conduit à une diminution de la prolifération, de la migration, de l'invasion ainsi qu'une réversion de l'EMT. Ceci se traduit par une augmentation de l'expression de E-cadhérine, et une diminution de N-cadhérine, vimentine ainsi que des métalloprotéinases matricielles MMP-2 et MMP-9 (Xiao et al. 2014; Shi et al. 2016; Song et al. 2017). *In vivo*, la diminution des niveaux protéiques de BAG3 dans un modèle de xénogreffes inhibe la croissance tumorale et l'expression des marqueurs de l'EMT (Song et al. 2017). Ainsi, ces études ont mis en avant que la surexpression

de BAG3 dans des cellules cancéreuses favorise la progression tumorale et les processus métastatiques.

Remarquablement, les résultats de ces études s'opposent : une surexpression ou une déplétion de BAG3 conduit soit aux mêmes phénotypes soit aux phénotypes inverses. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'une dérégulation, positive ou négative, des niveaux de BAG3 conduirait à un déséquilibre des complexes protéiques et/ou de l'activité de protéines modulées par celui-ci, perturbant alors les mêmes voies de signalisation. De plus, il est important de prendre en considération le contexte cellulaire, puisque chaque cancer est capable de détourner différemment des voies de signalisation. Au final, le point convergeant est que l'expression contrôlée de BAG3 est primordiale pour maintenir des processus cellulaires normaux. Cependant, il apparaît que BAG3 puisse être soit bénéfique soit préjudiciable à la progression tumorale dépendant du contexte cellulaire, et qu'une meilleure compréhension moléculaire de l'action de BAG3 et de sa régulation dans différents contextes est requise.

Ainsi, aucune de ces études n'a adressé le rôle des différents chaperons associés à BAG3. Le mode d'action de BAG3 et de ses partenaires dans l'invasion tumorale demeure donc imprécis. Sur la base de l'étude de Colvin et al. 2014, il est permis de penser que dans certains contextes, sa fonction de co-chaperon via HSP70 et/ou HSPB8 puisse contribuer à ses effets sur la dynamique du cytosquelette d'actine. Dans le contexte des cellules musculaires par contre, outre le mécanisme de la CASA, des évidences claires impliquent la fonction de BAG3 en tant co-chaperon de HSC/HSP70 dans le contrôle de qualité des structures d'actine contractiles, et seront décrites maintenant.

1.3.4.2.3. *Stabilité et intégrité du disque Z.*

Dans les cellules musculaires, BAG3 joue un rôle essentiel dans la stabilité structurale du disque Z. L'inactivation du gène *bag3* dans des souris (souris « *knock out* » *bag3*^{-/-}) ou l'application d'étirements mécaniques sur des cardiomyocytes de rats néonataux dépourvus de BAG3 perturbe l'ultrastructure du disque Z et par conséquent engendre la désintégration des myofibrilles (Homma et al. 2006; Hishiya, Kitazawa, et Takayama 2010; Ruparelia et al. 2014). Entre autres, les souris *bag3*^{-/-} présentent une dégénérescence accélérée des muscles les plus sollicités, comme ceux de la jambe ou du diaphragme (Homma et al. 2006). Le même phénotype a été observé avec l'orthologue de BAG3, Starvin chez la drosophile, c'est-à-dire qu'une diminution de l'expression de la protéine

entraîne la désintégration du disque Z résultant en une altération générale de la fonction des cellules musculaires (Arndt et al. 2010). Ceci a mis en évidence que BAG3 est importante pour la survie des myotubes matures et donc pour la maintenance du muscle squelettique mature. Remarquablement, BAG3 co-localise dans le disque Z avec deux des ABP primordiales pour la structure de celui-ci : α -actinine (Homma et al. 2006; Arndt et al. 2010) et CapZ β 1, une sous-unité de CapZ (Hishiya, Kitazawa, et Takayama 2010). De plus, HSC70 favorise l'activité de coiffage de CapZ β 1 (Tardieux et al. 1998) et il a été mis en évidence que BAG3 module l'interaction entre HSC70 et CapZ β 1 afin d'assurer la localisation de CapZ au disque Z et empêcher sa dégradation par la voie du protéasome (Hishiya, Kitazawa, et Takayama 2010). Notamment, la surexpression de CapZ β 1 inhibe la perturbation myofibrillaire dans les cellules déplétées en BAG3. Ensembles, ces résultats suggèrent un rôle de BAG3 dans le soutien des connexions cytosquelettiques entre le disque Z et les myofibrilles, dans la stabilisation de la structure des myofibrilles et dans l'inhibition de la dégénérescence myofibrillaire en réponse à des contraintes mécaniques. Ces résultats appuient aussi l'importance de la relation étroite entre les fonctions cellulaires et l'architecture ainsi que l'intégrité structurale du cytosquelette d'actine. Corroborant cette idée, il a aussi été suggéré que l'association de BAG3 avec la chaîne lourde de myosine II est nécessaire à la stabilisation des myofibrilles dans le muscle squelettique en prévenant son ubiquitination et sa dégradation protéasomale (Hong et al. 2016). Cependant, l'étude ne s'est pas intéressée à un potentiel lien avec HSC/HSP70 ou HSPB8.

L'ensemble de ces observations suggère que BAG3 est une composante importante dans le CQP du cytosquelette d'actine et de ses protéines régulatrices dans le contexte des cellules musculaires. Dans les cellules non musculaires, BAG3 émerge comme une protéine modulatrice de la dynamique du cytosquelette d'actine via son rôle d'adaptateur dans la signalisation cellulaire, mais l'implication de ses chaperons associés dans de telles fonctions a été très peu étudiée. Par ailleurs, l'émergence du rôle de l'autophagie sélective dans le remodelage dynamique du cytosquelette d'actine, incluant le mécanisme de la CASA, appuie l'importance d'une régulation spatio-temporelle de la dégradation ciblée de protéines dans ce processus. L'étude sur la fonction de p62 en tant que modulateur spatio-temporel des niveaux de RhoA actif pendant la migration cellulaire est un exemple qui illustre bien ce principe (Belaid et al. 2014).

Aussi, de nombreux processus cellulaires requièrent une haute dynamique d'actine et la mécanotransduction, comme l'adhésion cellulaire, la migration et le renouvellement des FA, et mettent en jeu l'activité de BAG3 et l'autophagie. Bien que la CASA a été étudiée uniquement dans

les cellules musculaires pour le moment, il ne serait toutefois pas étonnant que la CASA soit également impliquée dans la régulation de ces processus.

Par ailleurs, bien que HSPB8 possède des fonctions en lien avec le cytosquelette d'actine, jusqu'à récemment, aucune démonstration claire de cette fonction du chaperon n'était établie, ni si celle-ci mettait en jeu son interaction avec BAG3. En effet, nous avons depuis peu identifié une fonction pour le complexe BAG3-HSPB8 lors de la division cellulaire, donc un processus indépendant du stress, dans la facilitation du remodelage du cytosquelette d'actine (Fuchs et al, 2015; Varlet et al, 2017). Ces travaux feront l'objet d'une discussion approfondie à la section 1.4.4. Néanmoins, les mécanismes moléculaires orchestrant la modulation du cytosquelette d'actine par le complexe chaperon BAG3-HSPB8 restent à élucider.

Dans l'optique d'évaluer et de préciser l'impact de BAG3 sur le remodelage du cytosquelette d'actine, le contexte de la division des cellules cancéreuses nous est apparu comme un modèle de choix. En effet, puisque la mitose nécessite le remodelage des structures cellulaires le plus drastique au cours de la vie d'une cellule et que le cytosquelette d'actine subit des tensions mécaniques importantes au cours de ce processus, nous avons émis l'hypothèse que le complexe chaperon BAG3-HSP70-HSPB8-p62 contribuerait à soutenir le remodelage des structures cellulaires à base d'actine qui dirigent la division cellulaire. La prochaine section aura pour but d'exposer les mécanismes moléculaires qui gèrent les différentes étapes de la division mitotique, en se concentrant majoritairement sur la modulation du remodelage du cytosquelette d'actine. Nous introduirons également les résultats du laboratoire concernant l'implication des membres du complexe chaperon BAG3-HSP70-HSPB8-p62 dans la division cellulaire.

1.4. Contribution de BAG3-HSPB8 dans les changements drastiques de l'architecture du cytosquelette d'actine pendant la mitose qui guide le positionnement du fuseau mitotique.

Le cycle cellulaire consiste en la duplication fidèle du génome pendant la phase S (phase de synthèse) et en la séparation uniforme des chromosomes et des composants subcellulaires dans deux cellules filles identiques au cours de la mitose (phase M). Ces deux étapes fondamentales sont séparées par des phases « d'intervalle » G1 et G2 qui sont requises pour préparer la réplication de l'ADN ainsi que le bon déroulement de la mitose. L'interphase correspond au regroupement des phases G1, S et G2 (fig. 1.16). D'une manière générale, le cycle cellulaire, et particulièrement les

transitions entre les différentes phases, sont contrôlées par les kinases dépendantes des cyclines (« *Cyclin Dependent Kinase* » ou CDK) qui sont exprimées de façon constitutive dans les cellules. Néanmoins leur activité est dépendante de leur liaison à leurs sous-unités régulatrices : les cyclines. Ces protéines sont synthétisées et dégradées de manière cyclique à des moments spécifiques du cycle, contrôlant ainsi la coordination de l'activation des CDK et assurant de ce fait la progression du cycle cellulaire (Morgan 1995). Par exemple, CDK1, en association avec cycline B, est la kinase majeure du contrôle de l'entrée et de la sortie des cellules en mitose (fig. 1.17 ; Moreno, Hayles, et Nurse 1989; Murray, Solomon, et Kirschner 1989; Malumbres et Barbacid 2005).

La phase M comprend elle-même deux étapes : la mitose, où la cellule va procéder à la séparation physique du matériel génétique en cinq phases soit la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase ; et la cytokinèse, où la cellule répartit son cytoplasme, ses organelles et surtout procède à la séparation physique des cellules filles (= abscission).

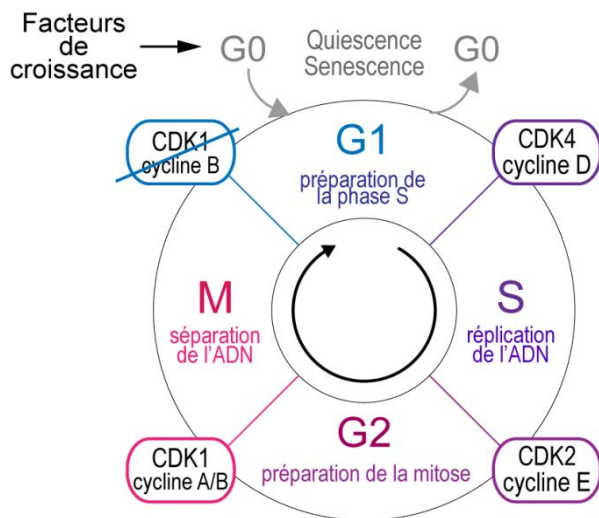


Figure 1.16: Représentation schématique du cycle cellulaire avec les complexes CDK/cyclines majeurs qui assurent la transition entre chaque phase (Morgan 2008).

Pour l'accomplissement de la mitose, une cellule réduit sa croissance, la transcription et subit des changements de structure et d'organisation cellulaires spectaculaires, incluant la condensation des chromosomes, le désassemblage des organelles (noyau, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi) et le remodelage des cytosquelettes. Par conséquent, la mitose est un processus extrêmement complexe, précis et hautement contrôlé, gouverné par un réseau sophistiqué de protéines qui assurent une multitude d'interactions protéine-protéine régulées massivement par des modifications post-traductionnelles, notamment via la phosphorylation dynamique des protéines par les protéines kinases et les phosphatases (Mochida et al. 2010; Hara et al. 2012; Jeong et Yang 2013; Heim, Konietzny, et Mayer 2015; Ma et al. 2016; Parrilla et al. 2016; Kim, Fernandes, et Lee 2016; Wang

et al. 2016; Vigneron et al. 2016; Cuijpers et Vertegaal 2018; Castro et Lorca 2018; Nasa et Kettenbach 2018). Outre CDK1, de nombreuses kinases ont été répertoriées comme assurant une fonction mitotique importante telles que Aurora A ou PLK1 (« *Polo-Like Kinase 1* »; Ferrari 2006; Salaün, Rannou, et Prigent 2008; Joukov et Nicolo 2018; Zheng et Yu 2018).

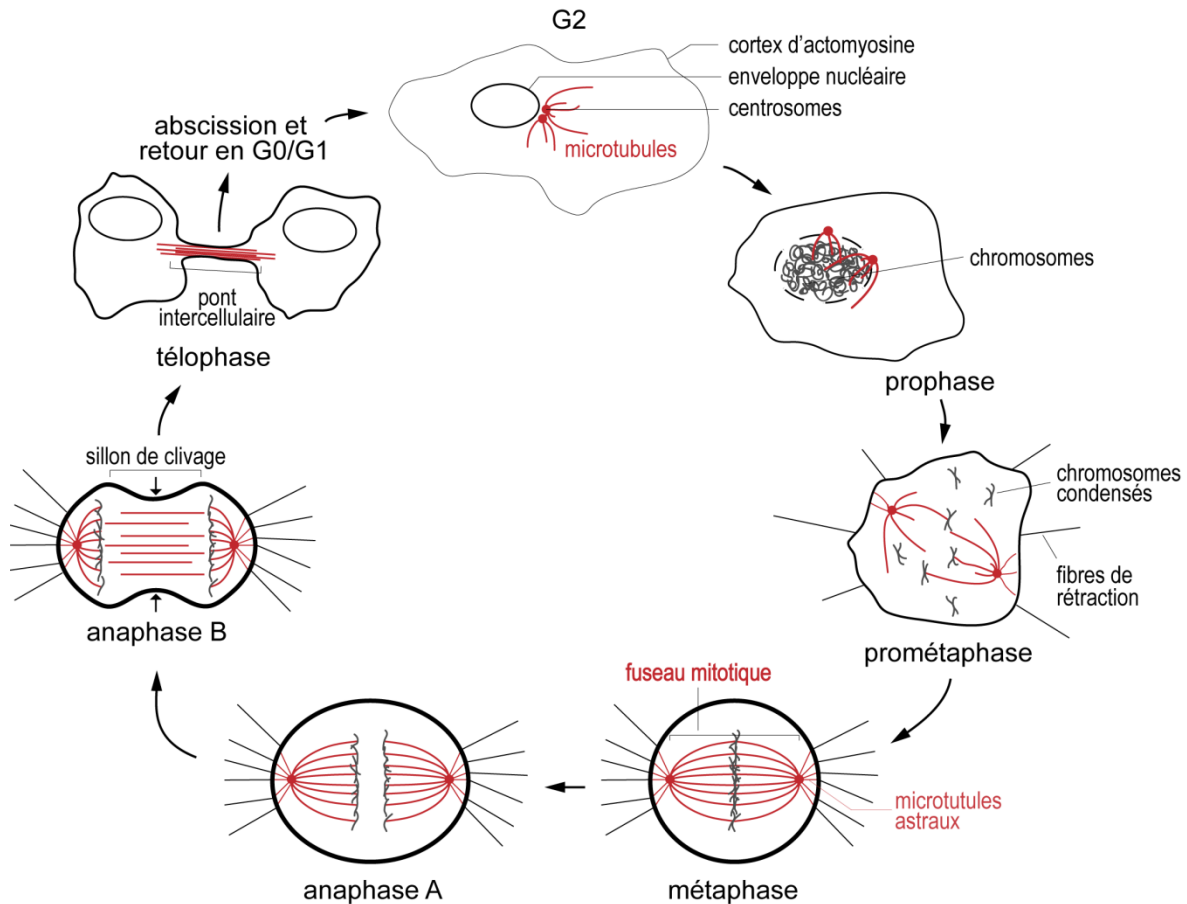


Figure 1.17 : Les étapes de la mitose et les changements morphologiques cellulaires drastiques associés.

La mitose se divise en cinq étapes. La **prophase** est marquée par la condensation de l'ADN, la rupture de l'enveloppe nucléaire et les centrosomes, futurs pôles du fuseau mitotique, se séparent. En **prométaphase**, la capture des chromosomes est initiée par les microtubules du fuseau mitotique en formation. La cellule commence à s'arrondir grâce au remodelage et à la contraction du cortex d'actomyosine. Lorsque chaque chromosome est attaché à une fibre du fuseau mitotique, ces derniers sont alors alignés à la plaque équatoriale de la cellule ou plaque métaphasique en **métaphase**. À ce stade, la cellule est ronde et les pôles du fuseau sont positionnés symétriquement de part et d'autre de la cellule, grâce aux microtubules astraux qui sont ancrés au niveau du cortex d'actomyosine (par exemple par la protéine motrice dynéine). Les chromatides sœurs sont séparées et tractées vers les centrosomes en **anaphase A** et la cellule commence à s'allonger. En **anaphase B**, une séparation physique du matériel génétique des futures cellules filles est assurée par la formation de l'anneau contractile, composé d'un réseau d'actomyosine, qui contracte le cortex formant ainsi le sillón de clivage. En **télophase**, la séparation des cellules s'achève : l'anneau se contracte jusqu'à former une structure compacte de microtubules (pont intercellulaire), les cellules se ré-étalent, les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme. Enfin la séparation physique définitive a lieu par un processus nommé l'**abscission**.

L'entrée des cellules en mitose est marquée par une réorganisation drastique de l'ensemble des cytosquelettes cellulaires (fig. 1.17). Les filaments intermédiaires qui sont associés à l'enveloppe nucléaire, c'est-à-dire les lamines, qui assurent entre autres le soutien mécanique du noyau, sont également dissociées afin de faciliter le désassemblage de l'enveloppe nucléaire, processus nommé rupture de l'enveloppe nucléaire (« *nuclear envelope breakdown* » ou NEBD). L'intégralité du réseau de microtubules se réorganise afin de former le fuseau mitotique qui assure la capture des chromosomes, leur ségrégation et leur répartition. Enfin les structures à base d'actine, comme les fibres de stress ou les lamellipodes, sont désassemblées et réorganisées afin d'assurer l'arrondissement de la cellule et la formation d'un cortex rigide d'actomyosine qui guident l'orientation et le positionnement du fuseau mitotique. De manière importante, tant l'entrée des cellules en mitose que la cytokinèse, et même le cycle cellulaire d'une manière globale, dépendent d'un remodelage précis de structures à base d'actine (Heng et Koh 2010).

L'assemblage du fuseau mitotique consiste en la nucléation et l'organisation des microtubules (MT), qui sont des polymères de tubulines α et β , à partir des centrosomes (Manning et Kumar 2007; Bornens 2012). En dehors du cycle cellulaire, une cellule possède un seul centrosome, qui est le centre majeur d'organisation des microtubules. Sa duplication se produit une seule fois pendant le cycle cellulaire et est initiée en G1/S (Wang, Jiang, et Zhang 2014). Suite à leur séparation et leur maturation, à la transition G2/M et au début de la mitose, les centrosomes définissent alors les deux pôles du fuseau et pour permettre l'assemblage du fuseau mitotique juste après la NEBD (Wang, Jiang, et Zhang 2014; Asteriti, De Mattia, et Guarguaglini 2015; Joukov et Nicolo 2018). Le fuseau mitotique consiste alors en un réseau de MT dont on distingue trois catégories : les MT kinétochoriens (MT-k) qui capturent, attachent et assurent la médiation du mouvement des chromosomes à la plaque équatoriale lorsque chaque chromatide sœur de ceux-ci a été capturée par des MT-K émanant des pôles opposés (Dumont et Mitchison 2009; Foley et Kapoor 2013). La métaphase correspond donc au stade où tous les chromosomes sont alignés à la plaque équatoriale. L'anaphase est initiée uniquement lorsque tous les chromosomes sont attachés par les MT-K et qu'une tension adéquate, provenant de chaque pôle et qui « attire » chacune des chromatides sœurs, est appliquée sur les kinétochores (Bakhoun et al. 2009; Dumont et Mitchison 2009; Foley et Kapoor 2013). Les MT non-kinétochoriens ont un rôle plus structural : un glissement entre des nK-MT provenant de pôles opposés permet de séparer les pôles et de stabiliser le fuseau mitotique (Dumont et Mitchison 2009). Enfin, les *microtubules astraux* (MT-A) émanent des pôles du fuseau et sont cruciaux pour le positionnement du fuseau mitotique (discuté section 1.4.2) car ils assurent son interaction avec le cortex d'actomyosine cellulaire (Bergstralh, Dawney, et Johnston 2017).

Devant l'ampleur des connaissances accumulées, nous allons ici décrire brièvement le contrôle de la transition G2/M et la régulation de la mitose par le complexe CDK1-cycline B et focaliser notre intérêt majoritairement sur les modifications de l'architecture du cytosquelette d'actine qui guident l'orientation du fuseau mitotique de la transition G2/M à la transition métaphase-anaphase.

1.4.1. CDK1, la kinase majeure de la phase M qui contrôle l'entrée et la sortie de la mitose.

La kinase 1 dépendante des cyclines ou CDK1 est un régulateur essentiel de nombreux processus mitotiques, notamment la condensation (Abe et al. 2011; Robellet et al. 2015) et la ségrégation des chromosomes (Kabeche et Compton 2013; Godek, Kabeche, et Compton 2015; Dumitru et al. 2017), la rupture de l'enveloppe nucléaire (Lüscher et al. 1991; Georgatos, Pyrpassopoulou, et Theodoropoulos 1997; de Castro et al. 2017), ou encore la réorganisation des cytosquelettes dont la formation du fuseau mitotique. De ce fait, une dérégulation de l'activité de CDK1 entraîne des défauts sévères dans ces processus, conduisant à l'aneuploïdie (Tsichlis, Hatziapostolou, et Hinds 2007; Ma et al. 2012; de Castro et al. 2017)

L'activité de CDK1, conservée de la levure à l'humain, a été montrée être impérativement requise pour l'entrée des cellules en mitose, positionnant la kinase comme le régulateur clé de cette phase (Santamaría et al. 2007). Déjà, en culture cellulaire, l'inhibition de l'activité de CDK1 empêche la transition G2/M, traduit par un blocage de la cellule en phase G2 tardive (Vassilev 2006). *In vivo*, seule la perte de CDK1 dans des souris engendre une division cellulaire altérée, contrairement aux autres CDK, au tout début du développement embryonnaire (Santamaría et al. 2007). Ces résultats indiquent que l'activité de CDK1 ne peut pas être compensée par les autres CDK interphasiques, mais surtout signifient que CDK1 est absolument cruciale pour la division cellulaire. À l'inverse, CDK1 compense la perte des autres CDK et exécute tous les événements nécessaires à la gestion de la division cellulaire, révélant donc que CDK1 est la seule CDK essentielle du cycle cellulaire (Santamaría et al. 2007).

Deux transitions majeures sont requises pour la division cellulaire : la transition G2/M et la transition métaphase/anaphase, toutes deux étant intimement reliées au contrôle de l'activité de CDK1. Comme mentionné plus tôt, l'expression de CDK1 est constante à travers le cycle cellulaire. Néanmoins, son activité est limitée principalement de la phase G2 à la sortie de la mitose, puisque celle-ci est étroitement reliée à l'oscillation de l'expression/dégradation temporelle des cyclines A et B (Hunt 1989; Draetta et al. 1989; Gautier et al. 1990; Roy et al. 1991; Pines et Hunter 1991). De

ce fait, l'entrée des cellules en mitose (transition G2/M) est dictée par l'activation de CDK1 grâce à son association aux cyclines et la modulation de sa phosphorylation, tandis que la sortie de la mitose (transition métaphase/anaphase) est gouvernée par son inactivation, via la dégradation des cyclines.

1.4.1.1. Contrôle de l'entrée en mitose par l'activation de CDK1 : un rôle fondamental de sa liaison aux cyclines et de la modulation de sa phosphorylation.

Plus précisément, cycline A est exprimée à la fin de la phase G1 tandis que le pic de synthèse de cycline B a lieu en phase G2 (Obaya et Sedivy 2002; Morgan 2008). Le modèle actuel suggère la formation du complexe CDK1-cycline A contribuerait à l'activation d'Aurora A pendant la phase G2, qui elle-même favorise l'activation de PLK1 (fig. 1.18; Vigneron et al. 2018; Zheng et Yu 2018; Seki et al. 2008; Asteriti, De Mattia, et Guarguaglini 2015; Gheghiani et al. 2017; Joukov et Nicolo 2018). Ensuite, l'activation de CDK1 associée à cycline B serait initiée aux centrosomes par PLK1 et Aurora A (De Souza, Ellem, et Gabrielli 2000; Vigneron et al. 2018). En outre, un pic d'activité de CDK1-cycline B se produirait juste avant la NEBD (environ 10 minutes avant dans les cellules HeLa) et enclencherait l'entrée des cellules en mitose, coïncidant avec la translocation nucléaire du complexe (Murray, Solomon, et Kirschner 1989; Li, Meyer, et Donoghue 1997; Hagting et al. 1999; Takizawa et Morgan 2000; Gavet et Pines 2010). La translocation nucléaire de cycline B semble d'ailleurs dépendante de cycline A (Gong et al. 2007). Ensuite, l'augmentation progressive de l'activité du complexe coordonnerait les différents événements mitotiques (Gavet et Pines 2010).

Au-delà de l'association aux cyclines, d'autres mécanismes contribueraient à la régulation de l'activité de CDK1. En outre, CDK1 est phosphorylée en interphase au sein de sa poche de liaison à l'ATP sur les résidus thréonine 14 (T14) et tyrosine 15 (Y15) inhibant de ce fait son activité kinase (Atherton-Fessler et al. 1994). À l'approche de la mitose, les phosphatases cdc25 (trois isoformes A, B et C) déphosphorylent ces deux résidus et assurent la levée de l'inhibition de CDK1 (Strausfeld et al. 1991; Timofeev et al. 2010). En effet ces phosphatases sont à double spécificité, c'est-à-dire qu'elles déphosphorylent les résidus tyrosines comme sérines/thréonines. Aurora A et PLK1 participeraient à l'amplification de l'activation de CDK1 durant la phase G2 (Dutertre et al. 2004; Cazales et al. 2005; Seki et al. 2008; Horn et al. 2010; Asteriti, De Mattia, et Guarguaglini 2015) en phosphorylant et activant les phosphatases cdc25 (fig. 1.18; Dutertre et al. 2004; Cazales et al. 2005; Gheghiani et al. 2017; Vigneron et al. 2018). Par ailleurs, la phosphorylation de la T161

de CDK1 stabilise l'interaction à cycline B et assure une activation complète de la kinase (Ducommun et al. 1991; Larochelle et al. 2007). De nombreuses autres boucles de rétrocontrôle ont été identifiées et étudiées, mais ne seront pas présentées ici, dépassant le cadre de cette introduction de thèse. Toutefois, l'ensemble de ces éléments donnent un bref aperçu du haut niveau de régulation et de complexité des mécanismes qui contrôlent l'activation de CDK1 et par conséquent l'entrée des cellules en mitose.

1.4.1.2. Inactivation de CDK1 via la dégradation des cyclines pour assurer la transition métaphase-anaphase.

Le dernier aspect de la régulation de CDK1 implique la dégradation temporelle des cyclines par le protéasome. Le complexe APC/C (« *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome* ») est une ubiquitine ligase E3 multi-protéique qui orchestre (entre autres) la transition métaphase-anaphase, à travers l'ubiquitination de substrats spécifiques en vue de leur dégradation protéasomale (fig. 1.18; Morgan 1999; Golan, Yudkovsky, et Hershko 2002; Alfieri, Zhang, et Barford 2017; Kernan, Bonacci, et Emanuele 2018). L'activité d'APC/C dépend de deux cofacteurs, à savoir Cdc20 (« *Cell division cycle 20* ») et Cdh1 (« *CDC20 homolog 1* »), qui sélectionnent les cibles, c'est-à-dire d'importantes protéines régulatrices du cycle cellulaire (Alfieri, Zhang, et Barford 2017). La coordination de la progression du cycle induite par APC/C est donc obtenue par la spécificité des substrats mais aussi via sa régulation spatio-temporelle. En l'occurrence, APC/C devient actif en début de mitose et cible cycline A à la prométaphase (Furuno, Elzen, et Pines 1999; Elzen et Pines 2001). Un fait intéressant est l'observation qu'une proportion de cycline A persiste après la prométaphase et serait dégradée plus tardivement, par autophagie, supposément sélective puisque cycline A interagit et co-localise partiellement avec p62 (Loukil et al. 2014). Bien que le rôle de l'autophagie demeure encore peu étudié pendant la mitose, la section (1.4.3) résumera l'état des connaissances actuelles à ce sujet. Enfin, l'ubiquitination de cycline B à la métaphase par APC/C (Clute et Pines 1999; Acquaviva et Pines 2006), aboutissant à sa dégradation par le protéasome, engendre l'inactivation de CDK1 contribuant alors à la transition vers l'anaphase (fig. 1.18; Rhind et Russell 2012).

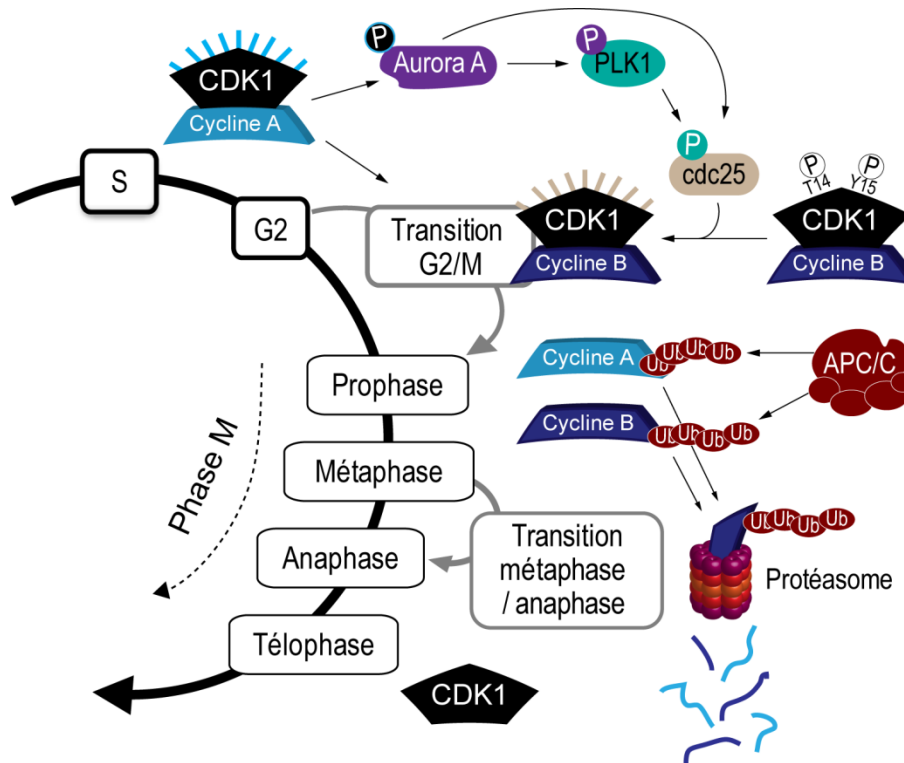


Figure 1.18: Schéma récapitulatif de la régulation de l'activité du complexe CDK1-cycline B de la phase G2 à la transition métaphase-anaphase et les acteurs moléculaires impliqués (Vigneron et al. 2018).

Il est à noter que dans le but d'étudier les événements se produisant dans les différentes phases mitotiques, de nombreuses méthodes de synchronisation de cellules ont été développées. Par exemple, il est possible d'inhiber la transition métaphase/anaphase, via l'inhibition du protéasome par le MG132. En outre, la division des cellules étant l'un des processus majeurs dérégulés pendant la tumorigénèse, il est d'une importance primordiale de disséquer minutieusement les processus moléculaires qui régissent cette étape du cycle cellulaire. D'ailleurs, des outils moléculaires tels que des inhibiteurs spécifiques de CDK1 comme le RO3306, ont été développés afin de limiter la croissance tumorale. Certains de ces outils ont été « détournés » afin de synchroniser des cellules dans le cycle cellulaire, juste avant l'entrée des cellules en mitose, à la transition G2/M. Différentes méthodes de synchronisation des cellules dans le cycle sont connues et utilisées pour étudier les événements se produisant dans chacune des phases. Ces techniques seront brièvement décrites dans la fig. (1.19) puisqu'elles seront exploitées dans cette étude.

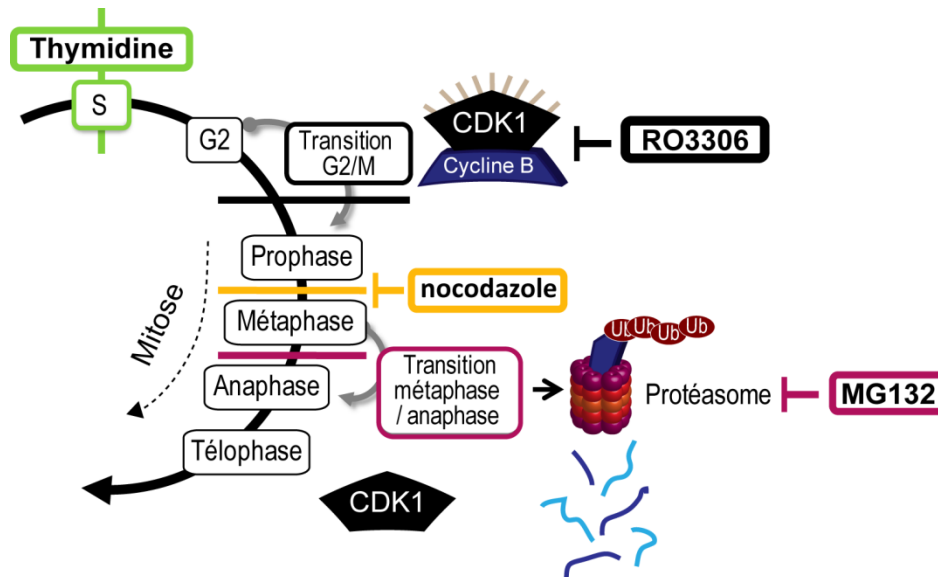


Figure 1.19: Méthode de synchronisation cellulaire. L'étude du cycle cellulaire, incluant donc la mitose, nécessite la capacité indispensable de synchroniser de grandes populations de cellules à différentes phases du cycle afin de disséquer et comprendre les processus critiques au cours de la progression du cycle cellulaire. Une variété de méthodes ont été développées depuis les années 50 pour obtenir des cellules majoritairement synchrones ou partiellement synchrones en mitose (Terasima et Tolmach 1963). La synchronisation des cellules en G1/S s'effectue avec un **double blocage à la thymidine** puisqu'un excès de thymidine inhibe la synthèse d'ADN et bloque donc les cellules juste avant la réplication de l'ADN. Après la relâche des cellules dans du milieu frais, la population cellulaire évolue dans le cycle cellulaire, et différents types d'analyses ont permis de déterminer que le pic de synchronisation mitotique se produit après 8 h de relâche des cellules (légèrement variable selon la lignée cellulaire) (G. Chen et Deng 2018). L'avantage est que cette méthode de synchronisation perturbe peu les cellules mitotiques avec un taux de synchronisation, en moyenne de 70%, de la prophase à la cytokinèse. Ceci permet aussi d'obtenir un panel de toutes les phases, ce qui se révèle très utile pour des analyses de phénotypes par exemple. La méthode du double blocage à la thymidine est très utilisée pour les analyses en microscopie où il est possible de faire de l'analyse de cellules individuelles. L'utilisation d'un **inhibiteur sélectif de CDK1, le RO3306** qui est un inhibiteur compétitif de l'ATP et est donc susceptible de se lier dans la poche d'ATP de CDK1, assure la synchronisation de la population cellulaire en G2/M, avec une efficacité de synchronisation >95% dans les lignées cellulaires cancéreuses (Vassilev et al. 2006; Vassilev 2006). De plus, ce blocage est réversible et permet une potentielle relâche des cellules en mitose au besoin. Le **nocodazole**, un agent dépolymérisateur des microtubules qui empêche la formation du fuseau mitotique, synchronise les cellules en début de mitose avec une efficacité d'environ 90% (prophase tardive ; Zieve et al. 1980). Pour obtenir une population synchrone à quasi 100%, cette méthode de synchronisation est combinée à la méthode de « shake-off » mitotique. En effet, tirant profit du fait que les cellules mitotiques s'arrondissent et sont donc moins adhérentes, il est possible de les recueillir par agitation mécanique. Cette méthode de « shake-off » mitotique, découverte à l'origine par Terasima et Tolmach, permet d'obtenir une population de cellules en prophase à presque 100 % (Terasima et Tolmach 1963). Le blocage au nocodazole est réversible et permet donc la relâche des cellules en mitose. D'ailleurs, après un « shake off », les cellules récupérées peuvent être remises en culture avec du milieu frais et vont progresser dans le cycle, et, en combinaison avec une drogue qui inhibe le protéasome (**MG132**), peuvent être synchronisées juste avant la transition métaphase/anaphase (Josefsberg et al. 2000; Chang, Xu, et Luo 2003; Lu et al. 2014). Mais cette approche est très peu utilisée en microscopie en raison de la toxicité des drogues utilisées sur les cytosquelettes.

Ces méthodes de synchronisation des cellules en culture dans les différentes phases du cycle constituent un outil puissant pour étudier le cycle cellulaire. Ceci a fortement contribué à la découverte et la compréhension de nombreux mécanismes moléculaires dirigeant les différentes phases.

1.4.1.3. Importance fonctionnelle de l'identification de nouveaux substrats de CDK1.

Avec plus de 30% du protéome phosphorylé pendant la mitose (sérines, thréonines et tyrosines confondues ; Welburn et Jeyaprakash 2018), les kinases sont considérées comme les régulatrices majeures de la mitose. Cependant, bien qu'il soit clair à ce jour que les événements mitotiques précoces et tardifs dépendent de la phosphorylation *massive* et *réversible* des protéines, il reste à identifier la nature de la plupart des substrats protéiques des kinases mitotiques et à clarifier les rôles précis qu'ils jouent dans la régulation de la mitose et de la cytokinèse.

Actuellement, grâce à l'utilisation de la phosphoprotéomique quantitative, plus de 10% de ces phosphorylations mitotiques ont été montrées être dépendantes de l'activité de CDK1 (Dephoure et al. 2008; Olsen et al. 2010; Petrone et al. 2016). Ceci représente des centaines, voire des milliers, de protéines phosphorylées par CDK1 pour coordonner avec précision la progression de la mitose contrôlée dans l'espace et le temps. Mais de manière surprenante, bien que le rôle de CDK1 dans la mitose soit bien établi, seul un nombre limité de ses substrats ont été identifiés et étudiés dans les cellules de mammifères, et particulièrement chez l'humain. Ainsi, l'identification des cibles et sites de phosphorylation spécifiques de CDK1 est importante, puisqu'elle fournira des informations mécanistiques sur la manière dont CDK1 contrôle le cycle cellulaire. CDK1 cible de préférence les protéines contenant le motif consensus [pS]/[pT]-P-X-R/K, et le consensus minimum de reconnaissance étant [pS]/[pT]-P (Dephoure et al. 2008; Welburn et Jeyaprakash 2018).

1.4.2. Remodelage du cytosquelette d'actine pendant la mitose : un guide pour le positionnement du fuseau mitotique.

L'entièreté du cytosquelette cellulaire subit des changements morphologiques pharamineux pour assurer la division cellulaire, et ce, dans une fenêtre de temps restreinte. L'entrée des cellules en mitose s'accompagne d'un remodelage drastique de l'architecture cellulaire passant d'une géométrie plane à sphérique (Théry et Bornens 2008) qui nécessite une dissolution des structures d'actine interphasiques, incluant les fibres de stress et les adhésions focales (Dao, Dupuy, Gavet,

Caron, et de Gunzburg 2009; M. C. Jones et al. 2018; Dix et al. 2018), au profit de la formation d'un cortex d'actomyosine rigide. D'un autre côté, comme mentionné précédemment, le rôle fondamental du fuseau mitotique est d'orchestrer la capture, l'alignement et ségrégation des chromosomes (fig.1.18; Prosser et Pelletier 2017). L'assemblage, la structure et l'intégrité de cette structure se révèlent donc absolument capitaux pour maintenir l'intégrité du génome, tout comme son orientation et son positionnement au sein de la cellule en division. Or, il s'avère que ces processus sont hautement dépendants de la régulation fine et de l'intégrité des structures cellulaires à base d'actine. Par exemple, des défauts d'arrondissements des cellules ont été corrélés avec des retards de la progression mitotique associés à des défauts de morphologie du fuseau mitotique et de son orientation engendrant des défauts de la ségrégation des chromosomes (Kunda et Baum 2009; Lancaster, Le Berre, et al. 2013; Fuchs et al. 2015). Nous décrirons donc les processus cellulaires impliqués dans le remodelage du cytosquelette d'actine et nous focaliserons principalement sur ceux qui contribuent au positionnement du fuseau mitotique.

Le positionnement du fuseau mitotique dépend de tensions générées par la dynéine qui exerce des forces sur les microtubules astraux. De plus en plus de protéines sont découvertes comme étant impliquées dans le positionnement du fuseau mitotique, telle que NuMA (« *Nuclear and Mitotic Apparatus* »), LGN (leucine-glycine-asparagine), myosine X, les protéines ERM et bien d'autres, mais ne seront pas détaillées ici (Toyoshima et Nishida 2007b; Carreno et al. 2008; Solinet et al. 2013; Z. Zheng et al. 2013; Machicoane et al. 2014; Kwon et al. 2015; Vilmos et al. 2016; Bergstralh, Dawney, et Johnston 2017; Kschonsak et Hoffmann 2018). Cela dit, il est important de noter la complexité des mécanismes mis en place pour contrôler l'orientation et le positionnement du fuseau mitotique, soulignant que ce processus est vraiment primordial pour la division cellulaire. En effet, outre le maintien de l'intégrité du génome dans les cellules filles, le positionnement et l'orientation du fuseau mitotique définissent aussi l'axe de division cellulaire qui constitue un paramètre crucial pour dicter une division correcte au sein des tissus et par conséquent, assure la morphogénèse, le renouvellement et l'intégrité tissulaire (Siller et Doe 2009; Cadart et al. 2014; Petridou et Skourides 2014; Chanet et al. 2017; Pietro, Echard, et Morin 2016). Il apparaît donc primordial de déchiffrer et de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui guident le positionnement du fuseau mitotique.

Comme mentionné plus tôt, des défauts de positionnement du fuseau mitotique conduisent à des anomalies de la division cellulaire et ont été corrélés avec des anomalies de modulation des structures d'actine mitotiques. Les prochaines sections auront donc pour but de décrire ces

différentes structures et de détailler les acteurs moléculaires connus et impliqués dans ce remodelage du cytosquelette d'actine.

1.4.2.1. L'arrondissement cellulaire.

L'arrondissement cellulaire est nécessaire pour laisser l'espace requis à la formation du fuseau mitotique, à son positionnement ainsi qu'à la capture, l'alignement et la ségrégation des chromosomes (Cadart et al. 2014; Ramkumar et Baum 2016). Il a été montré que l'altération de l'arrondissement, en forçant les cellules à conserver une géométrie plane, a un effet marqué sur la formation et la stabilité du fuseau et conduit fréquemment à des erreurs de ségrégation des chromosomes engendrées par des défauts de la capture des chromosomes, et à l'aneuploïdie (Dao, Dupuy, Gavet, Caron, et de Gunzburg 2009; Lancaster, Le Berre, et al. 2013). Le positionnement du fuseau mitotique au centre de la cellule arrondie en métaphase, et parallèle au substrat dans les cellules en culture, quant à lui repose sur un équilibre des forces, incluant les forces de traction corticales exercées sur les microtubules astraux émanant des pôles du fuseau et les forces obtenues par l'interaction symétrique des microtubules astraux des deux pôles avec le cortex cellulaire (Kotak, Busso, et Gönczy 2012; Kotak et Gönczy 2013; Nestor-Bergmann, Goddard, et Woolner 2014). L'arrondissement est susceptible de faciliter ces interactions fuseau-cortex, en veillant à ce que le cortex reste à proximité du fuseau dans toutes les directions. En l'occurrence, dans les cellules aplaties avec un axe allongé, les microtubules astraux ne peuvent pas atteindre le cortex dans toutes les directions, ce qui entraîne un fuseau instable mal positionné (Cadart et al. 2014).

L'arrondissement cellulaire a été montré comme reposant sur le démantèlement des FA combinées à la dissolution des structures d'actine interphasiques en faveur de la formation d'un cortex actomyosine rigide et stable (Maddox et Burridge 2003; Jones et al. 2018). Les mécanismes moléculaires connus à ce jour pour orchestrer ces processus seront décrits ci-dessous.

1.4.2.1.1. Le désassemblage des adhésions focales.

Le démantèlement des FA est la première étape essentielle qui initie l'arrondissement mitotique (Yamakita et al. 1999) : interférer avec ce processus altère l'arrondissement, et conduit à des retards de la progression mitotique associés à des défauts de morphologie du fuseau mitotique et de la ségrégation des chromosomes .

Plusieurs mécanismes ont été identifiés comme favorisant cette dissolution. Tout d'abord, l'inhibition de l'activité des GTPases Rap1 et RhoA a été reportée comme un mécanisme favorisant la dissolution des FA. En effet, l'activation de Rap1 favorise l'assemblage des FA en interphase et l'activité de RhoA aux niveaux des FA soutient leur intégrité (Lawson et Burridge 2014). Ainsi, il a été montré que la modulation négative de l'activité de Rap1 pendant la mitose, par un mécanisme inconnu actuellement, est requise pour désassembler les FA et promouvoir l'arrondissement cellulaire (Dao, Dupuy, Gavet, Caron, et de Gunzburg 2009). D'ailleurs, la surexpression d'un mutant constitutivement actif de Rap1 inhibe le désassemblage de ces structures d'adhésion et induit des défauts d'arrondissement des cellules pendant la mitose, phénotype qui se manifeste par la persistance d'une morphologie cellulaire plus ou moins « plate » (Dao, Dupuy, Gavet, Caron, et de Gunzburg 2009; Lancaster, Le Berre, et al. 2013). De même, l'inhibition locale du recrutement et de l'activation de RhoA au niveau des FA par la protéine DEPDC1B (« *DEP domain containing 1B* »), dont l'expression augmente pendant la phase G2, contribuerait à la dissolution des FA à l'entrée des cellules en prophase (Marchesi et al. 2014). Néanmoins, il est important de noter que ce processus est spécifiquement localisé au niveau des FA et n'interfère pas avec l'activité globale de RhoA qui est requise pour la modulation d'autres structures à base d'actine pendant la mitose. Ceci illustre bien la nécessité de mécanismes, encore peu connus à ce jour, qui assurent une régulation spatio-temporelle de l'activité de ces enzymes.

De manière importante, une étude récente a suggéré que la régulation de l'activité de CDK1 en interphase serait essentielle pour la modulation des FA et du cytosquelette d'actine lui-même (Jones et al. 2018). D'une part l'activité de CDK1, en complexe avec cycline A2, favoriserait l'organisation de larges complexes d'adhésion et la formation de fibres de stress principalement en G1/S. D'autre part, l'entrée dans la phase G2 (plusieurs heures avant la mitose), serait marquée par une diminution de la taille des FA ainsi que par un désassemblage des fibres de stress au profit d'une distribution d'actine plus corticale. Ce processus serait médié par l'augmentation du taux de cycline B1 et par la phosphorylation inhibitrice de CDK1 sur Y15. Ceci suggère que l'inactivation de CDK1 en G2 serait le déclencheur du remodelage de l'adhérence et du cytosquelette d'actine en préparation de l'entrée des cellules en mitose. Enfin, l'activation de CDK1, en complexe avec cycline B1, initie l'entrée des cellules en mitose et favorise la dissociation des FA résiduelles et l'arrondissement cellulaire. Ces résultats révèlent un lien intime et imprévu entre la machinerie du cycle cellulaire et l'adhésion des cellules à la MEC. En outre, l'arrondissement cellulaire en prophase dépendrait de l'activité du complexe CDK1-cycline B puisqu'un inhibiteur de CDK1 réverse l'arrondissement (Gavet et Pines 2010). Ces études mettent en avant un rôle important de CDK1 dans le remodelage

des adhésions, suggérant aussi un lien entre la progression du cycle cellulaire et la mécanotransduction.

Enfin, des études ont montré que la phosphorylation mitotique de plusieurs composants principaux des FA, notamment intégrine $\beta 1$, la kinase FAK ou encore paxilline engendrerait une dissociation de ces protéines et contribuerait au démantèlement des FA (Yamakita et al. 1999; Suzuki et Takahashi 2003). En outre, FAK phosphorylée serait inactive et interagirait moins avec intégrine β , suggérant une dissociation des voies de transduction du signal impliquant intégrine et Src (Yamakita et al. 1999). D'autre part, intégrine $\beta 1$ serait phosphorylée sur des sites spécifiques pendant la mitose ce qui induirait une diminution de son association au cytosquelette d'actine (Suzuki et Takahashi 2003). Cependant, les kinases impliquées et les mécanismes moléculaires sous-jacents demeurent inconnus actuellement.

L'importance du démantèlement des FA est maintenant bien établie pour l'arrondissement et donc pour assurer une mitose normale ; mais de toute évidence, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'exécution et la régulation de ce processus commence à peine à être élucidée.

1.4.2.1.2. La formation, la rigidité et la tension du cortex.

Les modifications d'adhérence cellulaire s'accompagnent d'une réorganisation drastique du cytosquelette d'actine à l'entrée des cellules en mitose : les structures interphasiques à base d'actine comme les lamellipodes ou les fibres de stress sont également désassemblées pour faire place à l'assemblage d'un cortex rigide d'actomyosine qui corrèle avec l'arrondissement mitotique (Maddox et Burridge 2003; Théry et Bornens 2008; Jones et al. 2018).

Dans un premier temps, la formation, la stabilité et la rigidité du cortex d'actine à l'entrée des cellules en mitose dépend de l'ABP CapZ β , une protéine associée à BAG3, (Chugh et al. 2017) et des protéines de la famille ERM impliquées dans la liaison de la membrane plasmique au cytosquelette d'actine corticale (Ponwei 2016 ; Carreno et al. 2008; Kunda et al. 2008). De manière importante, la rigidité corticale est en fait requise pour l'arrondissement mitotique contre son environnement que ce soit en culture ou dans un tissu (Maddox et Burridge 2003; Kunda et al. 2008; Stewart et al. 2011; Ramanathan et al. 2015; Sorce et al. 2015). En outre, les propriétés

mécaniques des cellules mitotiques et leur réponse aux forces externes sont liées à la progression de la mitose dans des conditions de confinement mécanique (Cattin et al. 2015).

Il a aussi été mis en évidence que la formine mDia1 est le nucléateur d'actine nécessaire à l'assemblage du cortex mitotique à l'entrée des cellules en mitose (Ramanathan et al. 2015; Rosa et al. 2015; Chugh et al. 2017), alors que l'activité du complexe Arp2/3 n'est pas primordiale et est présumée être diminuée (Bovellan et al. 2014; Ramanathan et al. 2015; Rosa et al. 2015). Une fois le cortex d'actine formé, s'en suit un enrichissement progressif de myosine II au cortex, qui dépend de l'activité de CDK1 ainsi que de la kinase Rho (Ramanathan et al. 2015; Maddox et Burridge 2003; Matthews et al. 2012). Le modèle actuel du contrôle de l'activation de myosine II par la voie Rho en mitose, est que la GEF Ect2, ciblée par CDK1, est exportée dans le cytoplasme et assure l'activation de RhoA en prophase (Matthews et al. 2012; Rosa et al. 2015). Initialement, il a été démontré que RhoA est active pendant la mitose et stimule l'activation de la Rho kinase qui cible à son tour myosine II entraînant alors l'activité contractile de myosine et permettant ainsi la rétraction corticale lors de l'arrondissement mitotique (Maddox et Burridge 2003).

L'établissement de la tension corticale provient des tensions contractiles, où myosine II crée des contraintes contractiles en tirant les filaments d'actine les uns par rapport aux autres, qui est couplée à une augmentation de la pression intracellulaire (Kunda et al. 2008; Stewart et al. 2011; Sorce et al. 2015; Ramanathan et al. 2015). En fait, l'élévation de la pression hydrostatique intracellulaire en début de mitose engendre une augmentation de la contraction du cortex d'actomyosine conduisant alors à l'augmentation de la tension corticale. Ensemble ces augmentations de tensions et de pression dirigent l'arrondissement cellulaire.

Il a été montré que l'épaisseur d'actine corticale diminue à mesure que la tension augmente de la prométaphase à la métaphase (Ramanathan et al. 2015). Or, la tension corticale et la pression intracellulaire étant principalement modulées par myosine II, les modèles de génération de tension supposent généralement que l'actine agit comme un simple échafaudage et que la tension est déterminée par les quantités et l'activité de myosine II (Chugh et al. 2017). Cependant, une étude suggère qu'une quantité critique de F-actine est requise, démontrée par le fait que différentes ABP sont impliquées dans la régulation de l'épaisseur du cortex, et qu'un changement de celle-ci (tant augmentation que diminution) impacte la tension corticale (Chugh et al. 2017). Il apparaît donc qu'en plus de l'activité de myosine II, l'architecture du réseau d'actine est un régulateur clé de la tension contractile dans le cortex cellulaire mitotique (Chugh et al. 2017).

Par ailleurs, un criblage des gènes impliqués dans le processus d'arrondissement mitotique obtenu en mesurant la force et la pression intracellulaire générées par l'arrondissement, a identifié 49 gènes qui impactent négativement la force d'arrondissement, dont un grand nombre n'avait jamais été reporté comme un acteur mitotique (Toyoda et al. 2017). Entre autres, l'ABP α -actinine est localisée au cortex mitotique et facilite la localisation de myosine II au cortex conduisant à une augmentation de la tension corticale (Fischer-Friedrich et al. 2016; Toyoda et al. 2017). Cette étude suggère qu'un nombre important de facteurs moléculaires aident le processus d'arrondissement et que notre connaissance sur les mécanismes qui le dirigent est limitée.

1.4.2.2. Les fibres de rétraction et le nuage sous-cortical d'actine.

L'arrondissement cellulaire mitotique et le cortex d'actine, bien que fondamentaux, ne sont cependant pas suffisants pour assurer le bon positionnement du fuseau mitotique. L'organisation de structures mitotiques à base d'actine hautement dynamiques, comme les fibres de rétraction ou le nuage sous-cortical d'actine, aiderait les cellules à détecter leur environnement externe pour positionner le fuseau mitotique (Mitchison 1992; Cramer et Mitchison 1997; Mitsushima et al. 2010; Fink et al. 2011; Cadart et al. 2014).

Bien que les adhésions focales soient démantelées lors de l'entrée en mitose, la plupart des cellules animales conservent des connexions physiques avec leur environnement tout au long de la mitose. Pour ce faire, les cellules en culture émettent des tubules cytoplasmiques riches en actine nommés fibres de rétraction (FR), sorte de câbles d'actine qui maintiennent les cellules arrondies attachées à la matrice (Mitchison 1992; Cramer et Mitchison 1997; Théry et al. 2005; Fink et al. 2011). En outre, les FR permettent de lier le substrat au cortex d'actomyosine en mitose et assurent la « communication » entre ces deux structures (Théry et al. 2005). De manière importante, il a également été suggéré que ces fibres de rétraction fourniraient aux cellules une « mémoire » physique et établirait une sorte de « cartographie » correspondant à la projection du motif d'adhésion cellule-substrat interphasique (Théry et al. 2005; Théry et Bornens 2006; Toyoshima et Nishida 2007; Fink et al. 2011). Ensuite, elles permettraient de rétablir ces adhérences lors du réétalement des cellules à la sortie de la mitose (Mali, Wirtz, et Searson 2010; Michel et Dahmann 2016). Des structures similaires ont été observées dans les cellules mitotiques au sein d'un épithélium, où ces fibres maintiennent le contact physique entre les cellules et leur MEC basale sous-jacente et semblent contribuer à la restauration de la polarité apico-basale à la sortie de la

mitose (Ramkumar et Baum 2016; Jacquemet et Ivaska 2018). Ce mécanisme ne sera cependant pas détaillé ici.

Les mécanismes moléculaires régissant la formation des FR et leur composition ont été très peu étudiés et donc forcément, demeurent très peu connus. Ceci se révèle intrigant considérant le fait qu'il a été bien établi que la répartition spatiale et le positionnement des fibres de rétraction sur le substrat joue un rôle essentiel dans l'orientation du fuseau mitotique des cellules HeLa (Théry et al. 2005; Fink et al. 2011; Petridou et Skourides 2014). D'ailleurs, par des expériences d'ablation de ces FR au laser, il a été montré que la répartition polarisée des FR pendant la mitose constitue une mémoire du modèle d'adhérence en interphase et influence l'orientation du fuseau mitotique (Fink et al. 2011). Le mécanisme moléculaire par lequel les fibres de rétraction contrôlent le positionnement du fuseau mitotique implique la régulation spatio-temporelle de la dynamique d'une autre structure à base d'actine : le nuage sous-cortical d'actine (Fink et al. 2011). Cette structure d'actine amorphe et hautement dynamique est située, comme son nom l'indique, en périphérie du cortex des cellules mitotiques (Mitsushima et al. 2010). Soumis à un renouvellement rapide par polymérisation-dépolymérisation dépendant de l'activité du complexe Arp2/3 et de CDK1, le nuage sous-cortical arbore un mouvement circulaire continu et unidirectionnel (décrit aussi comme polarisé) sous le cortex de la prométaphase à la métaphase (Mitsushima et al. 2010).

Notamment, le positionnement et l'orientation du fuseau mitotique dépendraient de la dynamique du nuage sous-cortical d'actine et de la répartition des FR (Fink et al. 2011). Le modèle actuel est que les forces émises par les FR dirigent le mouvement dynamique du nuage sous-cortical d'actine pendant la mitose, qui lui-même produirait des forces de traction sur le fuseau mitotique conduisant alors à son positionnement correct (Fink et al. 2011). De ce fait, les forces transmises par les FR assurent ainsi la communication du substrat vers les pôles du fuseau mitotique (Mitsushima et al. 2010; Fink et al. 2011).

Concernant la composition des fibres de rétraction, seules quelques protéines ont été présentement localisées dans ces structures, par immunofluorescence, notamment ezrine, cortactine ou encore myosine X, une myosine non conventionnelle (Théry et al. 2005; Kwon et al. 2015). Ainsi, bien que l'importance de ces FR ait été établie, les déterminants moléculaires composant et orchestrant leur mise en place et le contrôle de leur dynamique restent encore à être élucidés. De plus, bien que lien entre FR-nuage sous-cortical-fuseau mitotique soit établi, les mécanismes moléculaires dictant la régulation du nuage sous-cortical d'actine en amont du complexe Arp2/3 demeurent inconnus.

1.4.2.3. L'établissement de complexes d'adhésions mitotiques : un concept émergent.

La conservation des connexions physiques des cellules mitotiques avec leur environnement tout au long de la mitose serait également assurée par l'établissement de complexes d'adhésions contribuant au positionnement du fuseau mitotique et assurant donc l'axe de division de la cellule. En l'occurrence, des évidences émergentes dans la littérature suggèrent l'existence de différents types de complexes d'adhésions pendant la mitose, dont la composition en dehors des intégrines demeure quasi inconnue. Ces adhésions mitotiques participeraient à la « mémoire moléculaire » des adhésions focales interphasiques (Jacquemet et Ivaska 2018).

Déjà, une persistance de FA, contenant intégrine $\beta 1$ et paxilline, serait présente à la surface ventrale de la cellule mitotique arrondie et contribuerait au positionnement du fuseau mitotique (Petridou et Skourides 2014; Morris et al. 2015; Taneja et al. 2016; Jacquemet et Ivaska 2018). De plus, plusieurs études ont établi un lien entre l'adhésion médiée par les intégrines $\beta 1$ et le positionnement du fuseau mitotique (Théry et al. 2005; Toyoshima et Nishida 2007, 2007; Morris et al. 2015). Il est proposé que les intégrines agissent en tant que capteurs de la membrane basale bien que la voie reliant ces derniers au reste de la cellule mitotique n'ait pas été clairement définie (Morris et al. 2015). Il a été montré par exemple que l'interaction de la kinase FAK avec paxilline est requise pour l'orientation du fuseau mitotique (Petridou et Skourides 2014). D'autre part, MISP (« *Mitotic Interactor and Substrate of PLK1* »), une protéine associée aux FA qui interagit entre autres avec FAK, est requise pour l'orientation et le positionnement du fuseau mitotique (Zhu et al. 2013; Maier et al. 2013; Nain et Cimini 2013; Tame et al. 2014; Kschonsak et Hoffmann 2018; Vodicska et al. 2018). Pour finir, il a aussi été suggéré que les intégrines ancrées au cortex basal des cellules en mitose alignent le fuseau mitotique parallèlement à la membrane basale (Morris et al. 2015). La liaison de la kinase ILK (« *Integrin-Linked Kinase* ») aux intégrines recrute le complexe dynéine/dynactine qui assurerait la liaison avec les microtubules astraux émanant des centrosomes pour repositionner le fuseau par rapport aux signaux extracellulaires (Morris et al. 2015). Ce mécanisme est en lien direct avec l'idée que la transmission des forces extracellulaires oriente le fuseau mitotique, décrit pour les fibres de rétraction. En outre, il a aussi montré que FAK propage les forces externes pour assurer le bon positionnement du fuseau mitotique (Petridou et Skourides 2014).

D'autre part, il y aurait mise en place « d'adhésions mitotiques » établissant le contact FR-substrat et contenant intégrine $\beta 1$, mais pas taline ni paxilline qui sont des composants clés des FA

« classiques » (Dix et al. 2018; Jacquemet et Ivaska 2018). Enfin, tout récemment, les « adhésions réticulaires », composées par intégrine $\beta 5$ mais dépourvues de pratiquement tous les composants de l'adhésome consensus, ont été identifiées comme une nouvelle classe distincte de complexes d'adhésions formés pendant l'interphase et préservés au niveau des sites d'attachement cellules-MEC tout au long de la division cellulaire (Lock et al. 2018). En outre, la déplétion d'intégrine $\beta 5$ perturbe la mitose et perturbe la transmission de la mémoire spatiale entre générations de cellules (Lock et al. 2018). La découverte de ces adhérences réticulaires apporte une nouvelle perspective au problème du maintien de la fixation des cellules à la MEC lors de l'arrondissement. Les caractéristiques distinctes des adhérences réticulaires, tant morphologique, que dynamique ou moléculaire, ouvrent la voie vers de nouveaux mécanismes moléculaires à explorer afin de mieux comprendre comment les cellules mitotiques conservent le lien avec la MEC (Lock et al. 2018).

L'ensemble de ces observations suggèrent que la communication cellule-substrat et la transmission des forces externes grâce aux FR, aux molécules et complexes d'adhésions mitotiques sont essentielles à l'orientation du fuseau mitotique laissant sous-entendre un rôle central de la mécanotransduction dans ce processus.

1.4.3. Le contrôle de qualité des protéines et le cycle cellulaire.

Le CQP constitue donc un acteur central de la progression du cycle cellulaire puisque la dégradation des cyclines est un mécanisme fondamental de ce processus. Par ailleurs, la réorganisation du cytosquelette d'actine est étroitement reliée au cycle cellulaire également (Heng et Koh 2010; Uroz et al 2018 ; Pugacheva et al 2006 ; Jones 2018). Enfin, comme présenté au cours de ce chapitre, l'importance de la relation entre CQP et le remodelage tout comme l'intégrité des structures à base d'actine n'est plus à débattre. Il est donc concevable que les changements morphologiques aussi drastiques que rapide ayant lieu pendant la mitose nécessitent une mobilisation accrue des acteurs du CQP. Malgré le peu d'études qui se soient penchées sur la question, quelques données allant dans ce sens commencent tout de même à émerger.

Notamment, un rôle pour le système ubiquitine-protéasome a été décrit dans la médiation de la dégradation de Eps8 (« *Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8* »), un régulateur de la GTPase Rac qui peut aussi agir comme protéine de réticulation et de coiffe des filaments d'actine (Disanza et al. 2004; Werner et al. 2013b). L'ubiquitination de Eps8 par SCF^{Fbxw5} (« *Skp1-Cul1-F-box F-Box And WD Repeat Domain Containing 5* »), induit une chute brutale de son niveau

d'expression pendant la G2, entraînant sa disparition au cortex cellulaire en début de mitose. Ce mécanisme a été montré comme nécessaire à l'arrondissement mitotique des cellules puisque l'incapacité à réduire les niveaux de Eps8 prolonge sa localisation dans le cortex cellulaire et induit des retards de l'arrondissement et de la progression de la mitose (Werner et al. 2013). À l'inverse, l'activité de coiffage de Eps8 est requise pour assurer le remodelage des structures d'actine pendant la cytokinèse et contribue donc à la complétion de la division cellulaire. La fluctuation des niveaux de Eps8 semble donc être un mécanisme important pour gérer les changements morpho-dynamiques cellulaires mitotiques.

Aussi, l'autophagie a été pendant longtemps considérée comme un mécanisme fortement inhibé pendant la mitose (Eskelinen et al. 2002; Furuya et al. 2010; Rubinsztein 2010; Li et Zhang 2016). Des travaux récents ont toutefois démontré que le flux autophagique est maintenu lors de la mitose bien que le nombre d'autophagosomes soit réduit durant cette période (Li et al. 2016). Ceci indique que certaines formes d'autophagie pourraient persister pendant la mitose. Comme mentionné dans la section 1.4.1.2, cycline A2 est dégradée par autophagie, et supposément l'autophagie sélective puisque la protéine interagit et co-localise partiellement avec p62 (Loukil et al. 2014). Par ailleurs, durant la cytokinèse, RhoA est séquestrée sous sa forme active de façon dépendante de p62 et dégradée par autophagie (Belaid, Cerezo, et al. 2013). Ceci a été montré par le fait que l'inhibition de la machinerie autophagique (par exemple via la déplétion des protéines ATG5 ou ATG7) induit une augmentation importante de la localisation de RhoA active au pont intercellulaire (Belaid, Cerezo, et al. 2013). Cette étude a donc mis en avant que l'autophagie sélective est un mécanisme crucial pour restreindre l'activité de la GTPase RhoA en cytokinèse.

Varlet et al. ont également récemment contribué à élargir les connaissances sur le sujet. En effet, il a été montré que la déplétion de HSPB8 induit différents défauts du remodelage des structures à base d'actine en cytokinèse, incluant une persistance de l'anneau contractile d'actomyosine et coïncidant avec des défauts d'abscission des cellules (Varlet et al. 2018). De manière importante, suivant la déplétion de HSPB8, de tels défauts sont corrigés par l'utilisation de drogues telles que la latrunculine A, qui séquestre les monomères d'actine, le CK666, qui inhibe Arp2/3 et par conséquent la polymérisation ramifiée d'actine, ainsi que par la rapamycine, qui favorise l'autophagie. À l'opposé, des cellules contrôles traitées avec des inhibiteurs de l'autophagie miment les phénotypes observés dans des cellules suivant la déplétion de HSPB8 (Varlet et al. 2018). Ces travaux suggèrent deux choses importantes. La première étant que le complexe BAG3-HSPB8 semblerait limiter la polymérisation de l'actine à l'anneau contractile via une possible modulation

de l'activité du complexe Arp2/3. La seconde est qu'une telle fonction du complexe dans la dynamique de la polymérisation de la F-actine pourrait faire intervenir sa fonction autophagique.

Ainsi, l'autophagie sélective semble active au cours de la division cellulaire et suggère que celle-ci est requise dans le contrôle de la progression mitotique. L'ensemble de ces résultats apportent des évidences que la régulation spatio-temporelle de protéines régulatrices du cytosquelette d'actine via le CQP constituerait un processus clé qui contribue aux changements de forme des cellules lors de l'entrée et de la sortie de la mitose.

Notamment, nous avons également identifié une fonction essentielle du complexe BAG3-HSPB8 au cours de la mitose, en lien avec la dynamique du cytosquelette d'actine, fonction qui sera décrite ci-dessous.

1.4.4. Un rôle pour le complexe chaperon BAG3-HSPB8 dans la dynamique du cytosquelette d'actine, l'orientation fuseau mitotique et la séparation correcte des chromosomes pendant la mitose.

Les évidences présentées dans cette introduction indiquent que l'orchestration minutieuse de la modulation spatio-temporelle du cytosquelette d'actine pendant la division cellulaire est requise depuis l'entrée des cellules en mitose jusqu'à l'abscission. Il apparaît également que toutes les structures d'actine mitotiques sont soumises et transmettent de nombreuses forces mécaniques. De plus, le CQP et ses acteurs émergent comme des modulateurs importants de ces processus.

En ce sens, nous avons également évoqué les nombreuses évidences qui indiquent que BAG3 est impliquée dans le remodelage et le maintien de l'intégrité de structures d'actine soumises à des tensions mécaniques, mécanisme suggéré dépendant de son activité autophagique. Enfin, ce co-chaperon possède une fonction fondamentale dans la stabilité de HSPB8, qui elle-même émerge comme un régulateur du remodelage et de l'intégrité des structures d'actine en conditions physiologiques. Néanmoins une telle fonction pour ces protéines en tant que complexe demeure inconnue. Combinant tous ces éléments, la mitose nous est apparue être un modèle d'étude unique pour évaluer l'implication de ce complexe dans le remodelage du cytosquelette d'actine.

De cette manière, notre équipe a mis en évidence un rôle important du complexe BAG3-HSPB8 dans l'architecture et la facilitation du remodelage du cytosquelette d'actine dans des cellules à

division rapide : les cellules cancéreuses HeLa et HELA PARENTALES CCL2 (Fuchs et al. 2015; Varlet et al. 2017). J'ai eu la chance de contribuer à la progression de ces travaux, qui seront exposés dans cette section.

L'étude de Fuchs et al. 2015 (annexe 1), a établi que BAG3 faciliterait plusieurs étapes clés du réarrangement des structures d'actine mitotiques, démontré par le fait que sa déplétion conduit à 1) des défauts d'arrondissement des cellules (fig. 7); 2) des défauts de la rigidité corticale (fig. 7 et 8); 3) une désorganisation et une distribution anormale des FR (fig. 7); 4) des défauts d'orientation et de positionnement du fuseau mitotique (fig. 3); 5) des défauts d'alignement des chromosomes à la plaque métaphasique et de leur ségrégation, le tout étant corrélé avec des retards importants de la progression des cellules dans la mitose (fig. 2 et 3). Sa déplétion provoque aussi des défauts de ré-étalement des cellules à la sortie de la mitose (Varlet et al. 2017) ainsi que l'apparition de cellules multinucléées (donc aneuploïdes, fig. 2) suggérant des défauts plus tardifs pendant la cytokinèse, comme par exemple des problèmes d'abscissions des cellules (Fuchs et al. 2015). Tant de défauts qui suggèrent un impact de la déplétion de BAG3 sur les processus de remodelage du cytosquelette d'actine tout au long de la division des cellules.

En outre, nous avons découvert que la déplétion de HSPB8 phénocopie les défauts de positionnement du fuseau mitotique et les défauts de distribution des FR induits par la déplétion de BAG3 (annexe 1, fig. 5 et 7 respectivement). En corrélation avec ce résultat, nous avons déterminé, grâce à une analyse structure-fonction de BAG3 via des expériences de déplétion-restauration des phénotypes avec des mutants des domaines d'interaction protéique de BAG3, que l'activité de BAG3 dans le positionnement et l'orientation du fuseau mitotique requièrent ses domaines IPV et PxxP (annexe 1, fig. 4). Ce résultat indique que la liaison à HSPB8 est essentielle à cette fonction mitotique de BAG3. Par ailleurs, l'implication du domaine PxxP dans les fonctions mitotiques de BAG3 suggère que sa fonction signalétique pourrait contribuer au bon déroulement des processus mitotiques. De manière surprenante, l'expression d'un mutant de perte de liaison à HSP70 corrige les défauts d'orientation du fuseau mitotique suivant la déplétion de BAG3, suggérant que l'association de ces protéines est dispensable pour cette fonction de BAG3 (annexe 1, fig. 4). Il est important de souligner, que notre étude est la première (et la seule à ce jour) à avoir montré une fonction de BAG3 dépendante de son activité de co-chaperon de HSPB8 mais non dépendante de son association à HSP70.

Aussi, nous avons découvert une augmentation de l'interaction entre BAG3 et p62 pendant la mitose (annexe 1, fig. 6). De plus, nous sommes les premiers, à notre connaissance, à avoir montré une interaction entre BAG3 et la déacétylase HDAC6 (qui pour rappel est un partenaire de p62, section 1.3.3) qui est elle aussi augmentée dans les extraits cellulaires mitotiques comparés à des extraits asynchrones (annexe 1, fig. 6). De manière importante, nos résultats indiquent que la déplétion de p62 récapitule les défauts phénotypiques induits par la déplétion de BAG3 sur la rigidité corticale, sur la distribution des fibres de rétraction et sur le positionnement du fuseau mitotique (annexe 1, fig. 6 et 7). Il est à noter qu'en 2011, une étude a suggéré que p62, via sa phosphorylation directe par la kinase CDK1 sur les résidus T269 et S272, est nécessaire pour maintenir des niveaux appropriés de cycline B pendant la mitose (Linares et al. 2011). De son côté, la fonction de HDAC6 sur sa cible α -tubuline pendant la mitose a été un peu explorée puisque l'acétylation d' α -tubuline est connue pour stabiliser les microtubules (Shi et al. 2015; Wang et al. 2016; Janke et Montagnac 2017). Par exemple, il a été montré que les protéines EWSR1 (« *EWS RNA binding protein 1* »), Kindlin 1 et CEP70 (« *Centrosomal Protein 70* ») contribueraient à l'inhibition de l'activité d'HDAC6, par un mécanisme moléculaire non élucidé, et par conséquent ont un impact sur la stabilité des microtubules et la progression mitotique (Wang et al. 2016; Patel et al. 2016; Shi et al. 2015). Fait intéressant, HDAC6 cible également des protéines du cytosquelette d'actine : cortactine et myosine II (Zhang et al. 2007; Zhang et al. 2015). Néanmoins, la régulation de l'activité de HDAC6 sur ces deux cibles, et par conséquent son implication dans le remodelage du cytosquelette d'actine, n'a pas été étudiée pendant la mitose.

Pour finir, nous avons constaté que BAG3 est enrichie dans la région périnucléaire et centrosomale dans les cellules arrêtées en G2/M avec du RO3306, de façon dépendante de son interaction à HSPB8, suggérant un rôle potentiel, non démontré présentement, dans l'entrée des cellules en mitose (annexe 1, fig. 5). Pendant la mitose, BAG3 présente une localisation enrichie aux pôles du fuseau mitotique et biochimiquement, nous avons découvert que BAG3 est hyperphosphorylée comme le démontre l'apparition d'un important retard de migration sur gel dans des extraits cellulaires mitotiques (annexe 1, fig. 1 et 5). Néanmoins, par des essais d'isolation des centrosomes dans des extraits de cellules mitotiques, nous avons montré qu'une proportion de protéines BAG3 enrichies au niveau des centrosomes est non-hyperphosphorylée (annexe 1, fig. 1). Enfin, la déplétion de HSPB8 interfère avec les niveaux protéiques de BAG3 (Varlet et al. 2017) et avec le retard de migration sur gel suggérant que la stabilité de BAG3 et sa phosphorylation mitotique sont, au moins en partie, dépendantes de HSPB8 (annexe 1, fig. 5). Ces résultats appuient donc l'importance de l'association de BAG3 à HSPB8 pendant la mitose et en a découlé une question

importante : puisque la fonction de BAG3 est dépendante de HSPB8 et que sa phosphorylation semble l'être également, est-ce que la phosphorylation de BAG3 modulerait son action mitotique ?

1.5. Hypothèse et Objectifs :

De plus en plus d'évidences s'accumulent et tendent à suggérer que BAG3 orchestre la modulation de structures à base d'actine dans différents contextes telles que la migration cellulaire, la contraction des cellules musculaires ou encore pendant la division cellulaire. Nous avons montré que BAG3 agit en étroite collaboration avec HSPB8 afin de faciliter le remodelage du cytosquelette d'actine qui guide l'orientation du fuseau mitotique et l'abscission des cellules filles. Cependant, bien que pendant la cytokinèse l'activité du complexe Arp2/3 semble être impliquée, le mécanisme moléculaire précis par lequel le complexe BAG3-HSPB8 agit sur ce remodelage pendant la mitose reste à élucider. De manière importante, nous avons démontré que BAG3 est phosphorylée pendant la mitose et s'associe plus fortement à ses partenaires p62 et HDAC6.

Nous avons donc émis l'hypothèse que la phosphorylation du co-chaperon moléculaire BAG3 au cours de la mitose constituerait l'élément régulateur qui faciliterait la modulation du cytosquelette et que cette fonction mitotique s'effectuerait en collaboration ou à travers les protéines p62 et HDAC6. Mes travaux de doctorat ont donc eu pour but de disséquer l'importance fonctionnelle de la phosphorylation mitotique de BAG3 ainsi que de comprendre la relation moléculaire entre le complexe chaperon BAG3-HSPB8 avec ses partenaires p62 et HDAC6.

1. Analyser l'importance fonctionnelle de la phosphorylation mitotique de BAG3 (chapitre 2 et 3).

Pour ce faire, une combinaison d'une analyse par spectrométrie de masse et d'essais biochimiques ont permis d'identifier les sites phosphorylés de BAG3 et d'évaluer quelles kinases cibles cette protéine pendant la mitose. Des essais de déplétion-restauration de phénotypes avec des mutants non-phosphorylables et phospho-mimétiques de BAG3 ont été utilisés afin de définir l'impact fonctionnel de certains sites de phosphorylation de BAG3 pendant la mitose.

2. Étudier la relation fonctionnelle entre les protéines du complexe BAG3-HSPB8-p62-HDAC6 pendant la mitose sur le remodelage des structures cellulaires à base d'actine (chapitre 4).

Pour cet objectif, une approche biochimique par co-immunoprécipitations avec des mutants de BAG3, couplée avec des essais déplétion-restauration de phénotypes suivant la déplétion des membres du complexe chaperon a été réalisée afin de mieux comprendre les interactions fonctionnelles entre ces protéines sur la modulation dynamique des structures mitotiques à base d'actine pendant la mitose.

L'ensemble de ces travaux a contribué à la compréhension du mécanisme moléculaire qui facilite le remodelage du cytosquelette d'actine au cours de la mitose régulé par la phosphorylation de BAG3 et en collaboration étroite avec ses partenaires HSPB8, p62 et HDAC6.

Chapitre 2

CDK1-mediated Phosphorylation of BAG3 Promotes Mitotic Cell Remodeling and the Molecular Assembly of Mitotic p62 bodies “MIBS”

Carole Luthold^{1,2}, Herman Lambert^{1,2}, Margit Fuchs^{1,2‡}, Solenn M. Guilbert^{1,2‡}, Marc-Antoine Rodrigue^{1,2}, Alice Anaïs Varlet^{1,2}, Aline Dumas³, Luc Vallières³, Amélie Fradet-Turcotte^{1,2} and
Josée N. Lavoie^{1,2*}

¹Université Laval Cancer Research Center&Department of Molecular Biology, Medical Biochemistry and Pathology, Medicine Faculty, Université Laval, Qc, Canada, G1V OA6

²CHU de Québec-Université Laval Research Center, Oncology division

³ CHU de Québec-Université Laval Research Center, Neurosciences division

[‡] **Authors contributes equally to this work**

Running Head: Phosphorylation of BAG3 regulates mitotic cell dynamics and MIBS

Keywords: BAG3, HSPB8, p62 bodies, CDK1, spindle orientation, mitotic rounding, actin, K63 polyubiquitin, protein quality control, MIBS

* Author for correspondence (josee.lavoie@crhdq.ulaval.ca)

* Dr. Josée N. LAVOIE

CRC, L'Hôtel-Dieu de Québec, CRCHU de Québec,

9 Rue McMahon, Québec, Qc. Canada, G1R 3S3

Phone: (418) 525-4444 ext. 15120

Fax: (418) 691-5439

2.1. Avant-propos

Les résultats présentés dans cet article sont des résultats originaux, où j'ai réalisé la majeure partie des expériences. Herman Lambert a obtenu les résultats relatifs aux figures : fig. 1.A; 1C; 2B; 4A; 5A à E; 7B et S1 et S2B. Margit Fuchs a obtenu les résultats relatifs aux figures 7C et S4.B. Solenn Guilbert a obtenu les résultats relatifs aux figures 7A et S3A. Marc Antoine Rodrigue a obtenu les résultats relatifs à la figure S4A. Alice Anaïs Varlet a contribué à l'obtention des données relatives à différentes figures (compte des phénotypes en double aveugle, mis au point d'expériences, etc...). Enfin Aline Dumas a fourni l'expertise technique pour l'analyse en microscopie à super-résolution (fig. 7C).

2.2. Résumé

Le co-chaperon moléculaire BAG3, en complexe avec la protéine de choc thermique HSPB8, facilite l'arrondissement mitotique, l'orientation du fuseau mitotique et la séparation adéquate des cellules filles pour compléter la cytokinèse. La fonction mitotique du complexe BAG3-HSPB8 impliquerait le séquestosome p62/SQSTM1, suggérant un rôle pour le contrôle de la qualité des protéines. Cependant, l'interaction fonctionnelle entre cette voie de signalisation assistée par un complexe chaperon et la machinerie mitotique demeure énigmatique. Dans ces travaux, nous montrons que la phosphorylation de BAG3 sur un motif conservé est régulée par CDK1 et active sa fonction dans le remodelage des cellules mitotiques. Ainsi, la phosphorylation de BAG3 a présenté une dynamique élevée à l'entrée de la mitose, et les mutants de BAG3 non phosphorylables et phospho-mimétiques n'ont pas pu corriger les défauts mitotiques dans les cellules HeLa appauvries en BAG3. Nous démontrons également que la phosphorylation de BAG3, ainsi que HSPB8 et CDK1, modulent l'assemblage moléculaire de p62/SQSTM1 en corps mitotiques hautement ordonnés contenant des chaînes de poly-ubiquitine de type K63 que nous avons dénommées MIBS (*mitotic inclusion body structures*). Ces résultats suggèrent l'existence d'un système de contrôle de qualité spatiale régulé par les signaux mitotiques, lequel pourrait assurer la fidélité du remodelage de la forme des cellules dans les cellules hautement prolifératives.

2.3. Abstract

The co-chaperone BAG3, in complex with the heat shock protein HSPB8, facilitates mitotic rounding, spindle orientation and proper abscission of daughter cells. The mitotic function of BAG3-HSPB8 would implicate the sequestosome p62/SQSTM1, suggesting a role for protein quality control. However, the interplay between this chaperone-assisted pathway and the mitotic machinery is largely unknown. Here we show that phosphorylation of BAG3 at a conserved motif is regulated by CDK1 and activates its function in mitotic cell remodeling. BAG3 phosphorylation exhibited high dynamics at mitotic entry, and both the non-phosphorylatable and phospho-mimetic BAG3 mutants were unable to correct the mitotic defects in BAG3-depleted HeLa cells. We also demonstrate that BAG3 phosphorylation, HSPB8, and CDK1 modulate the molecular assembly of p62/SQSTM1 into high-ordered mitotic bodies containing K63 polyubiquitinated chains that we termed MIBS (*mitotic inclusion body structures*). These findings suggest the existence of a mitotically-regulated system of spatial quality control for the fidelity of cell shape remodeling in highly dividing cells.

2.4. Introduction

Molecular chaperones of the heat shock protein family (HSP) and their co-chaperones play crucial roles in cellular pathways collectively referred to as the proteostasis network, which maintain the integrity of the cell proteome [1, 2]. Within this network, protein quality control (PQC) systems facilitate the dynamic assembly-disassembly of multiprotein complexes at a given location and time, and the spatial sequestration of superfluous or damaged protein substrates [3, 4]. These systems also mediate the timely repair/recycling or degradation of harmful misfolded products to prevent toxic protein aggregation. The fidelity of essential cellular functions like cell division depends on fine-tuned control of multiprotein assemblies that put high demands on the PQC systems [5, 6]. Mitosis is arguably the most dramatic process relying on a reversible reorganization of the overall cellular structures, typically within minutes. Not surprisingly, increasing connections between members of the HSP network and the progression of mitosis are being uncovered [7-22]. These connections are likely relevant for the progression of human diseases like cancer. Most human malignant cells are characterized by upregulation of HSP that may safeguard cancer cells experiencing increased genomic and proteomic instability, as well as mitotic stress [23, 24].

Co-chaperones provide molecular connections with cellular signaling pathways and degradation machineries, namely the ubiquitin-proteasome system and the macroautophagy machinery (hereafter named autophagy)[25, 26]. These connections enable PQC systems to dynamically adjust to meet the requirements of a cell whether during biological process relying on rapid remodeling of cellular structures, or under stressful conditions increasing proteomic damages. BAG3 is one of a family of co-chaperones characterized by a BAG domain that binds the HSP70/HSPA ATPase domain to regulate the fate of HSP70 substrates [27, 28]. BAG3 is unique amongst this family for its association with another chaperone system: the ATP-independent chaperones HSPB [29, 30]. HSPB are generally seen as holdases that bind damaged proteins and promote their sequestration in native-like conformation to facilitate their subsequent repair or deposit to protective sites within the cell[31]. In addition, HSPB chaperones would play important homeostatic roles in preserving the integrity of cytoskeletal structures[32]. BAG3 mainly acts as a partner of HSPB8, a divergent member of the family that bears a more substrate-selective chaperone activity [33, 34]. BAG3 also uniquely interacts with multiple signaling pathways via its modular protein structure that include a WW domain and Proline-rich motifs (PXXP), thereby acting as a signaling scaffold. Consistent with this, BAG3 can interact with numerous proteins with diverse activities and can exert multifaced functions in cytoskeletal dynamics, apoptosis, cell motility and invasion [26, 35, 36].

BAG3 is also reported to mediate selective macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) as an adaptive homeostasis mechanism during aging [37-39].

Still little is known regarding the functional significance of BAG3 interactions and how they may be regulated in different contexts. BAG3 is expressed at low levels in a few normal cell types but is highly expressed in cardiac and skeletal muscle cells and in several cancer cell types [26]. BAG3 expression can be induced in response to various stresses and is mainly controlled by heat shock transcription factors [40]. BAG3 also appears to undergo extensive post-translational modifications that may have functional consequences, but which remain, however, largely unexplored. Deciphering the mechanisms underlying BAG3 functions and relevant targets is critical to understand its implication in human diseases like cancer, since upregulation of BAG3 could be both beneficial and detrimental given the large spectrum of its activities.

One emerging model tends to integrate the functions of BAG3 in cellular PQC and signaling. Accumulating evidence suggests that BAG3 serves as a molecular platform to connect different chaperone systems to cellular pathways of protein degradation, nutrient sensing, cytoskeletal remodeling, and adaptation to proteotoxic stress and mechanical strain. For instance, under conditions of proteasome insufficiency, BAG3 cooperates with both HSPB8 and HSP70 to coordinate the sequestration of harmful proteins into cellular inclusions, and the mounting of an efficient antioxidant cellular defense [38, 39, 41, 42]. Within this pathway, the chaperone complex was found to regulate the sequestering activity of p62/SQSTM1 (hereafter referred to as p62), one of the key molecules for proteostasis that also possesses signaling functions [43, 44]. In cancer cells, BAG3 is reported to mediate the effects of HSP70 on signaling pathways that affect tumor formation [45]. Finally, in the context of muscle cells, BAG3 can orchestrate the assembly of a multichaperone complex that maintains the integrity of actin contractile structures by coordinating the stabilization, autophagic clearance, and transcriptional replenishing of an essential actin-binding protein damaged by contraction-dependent mechanical stress [46-48]. This finding points to an important physiological role for BAG3-mediated recruitment of PQC systems to biological processes relying on cytoskeleton rearrangements.

We showed that during mitosis, BAG3 cooperates with HSPB8 to facilitate the timely remodeling of actin-based structures that guide spindle orientation and accurate chromosome segregation [12, 49]. Cancer cells depleted of HSPB8 or BAG3 are delayed in prometaphase/metaphase and eventually progress through anaphase, showing increased incidence of aberrant cell division [12].

Importantly, the mitotic function of BAG3-HSPB8 would implicate p62, therefore arguing for a role for a PQC mechanism. Moreover, the chaperone complex can also regulate the dynamics of the contractile actin ring during cytokinesis, via a mechanism implicating autophagy signaling [50]. Drugs that limit actin dynamics can normalize the mitotic phenotypes and cell division in HSPB8-depleted cells, suggesting that the chaperone complex may limit actin assembly or promote actin structure turnover. Despite strong evidence involving BAG3-HSPB8 chaperone complex in the fidelity of mitotic cell remodeling, functional connections with the mitotic machinery are yet to be defined.

Here we addressed this issue by analyzing BAG3 mitotic phosphorylation at a molecular and functional levels. We demonstrate that the master mitotic kinase CDK1 phosphorylates BAG3 phosphorylation at T285 at mitotic entry to activate its HSPB8-dependent function in mitotic rounding and spindle orientation in HeLa cells. Furthermore, evidence is provided that such function also controls the molecular assembly of p62 into high-ordered mitotic bodies, which may provide a mechanism to sequester superfluous cellular components or to spatially segregate mitotic signaling for faithful mitotic progression in highly dividing cells.

2.5. Results

2.5.1. BAG3 is specifically phosphorylated at T285 at mitotic entry.

In previous work, we showed that BAG3 is hyperphosphorylated at mitotic entry and exhibits a supershifted band on SDS-PAGE [12]. To address the relevance for BAG3 mitotic function, we first sought to identify the residues on BAG3 that are phosphorylated in response to mitotic signals. Affinity purification (AP) combined with mass spectrometry (MS) identified different phospho-residues on BAG3 in HEK 293T cells that have been synchronized in mitosis by prolonged treatment with nocodazole, a microtubule poison arresting cells in mitosis. In-gel digestion of BAG3 supershifted band identified pSer289 and pSer291 with >99% confidence in phosphorylation site-specific localization (Ascore > 19) (Fig.S2.1, maximal Ascore for each site), in agreement with previous phosphoproteomics analyses (PhosphoSite Plus database)[51, 52]. While pT285 was identified with a lower confidence (max Ascore of 14), this site was not identified in interphase cells, suggesting that it was regulated by mitotic signals. Comparison of BAG3 sequences from different species revealed a high degree of conservation around these 3 phosphorylation sites that

are located within an uncharacterized region lying between the IPV and the PXXP motifs, both of which regulate BAG3 mitotic function (Fig. 2.1A)[12].

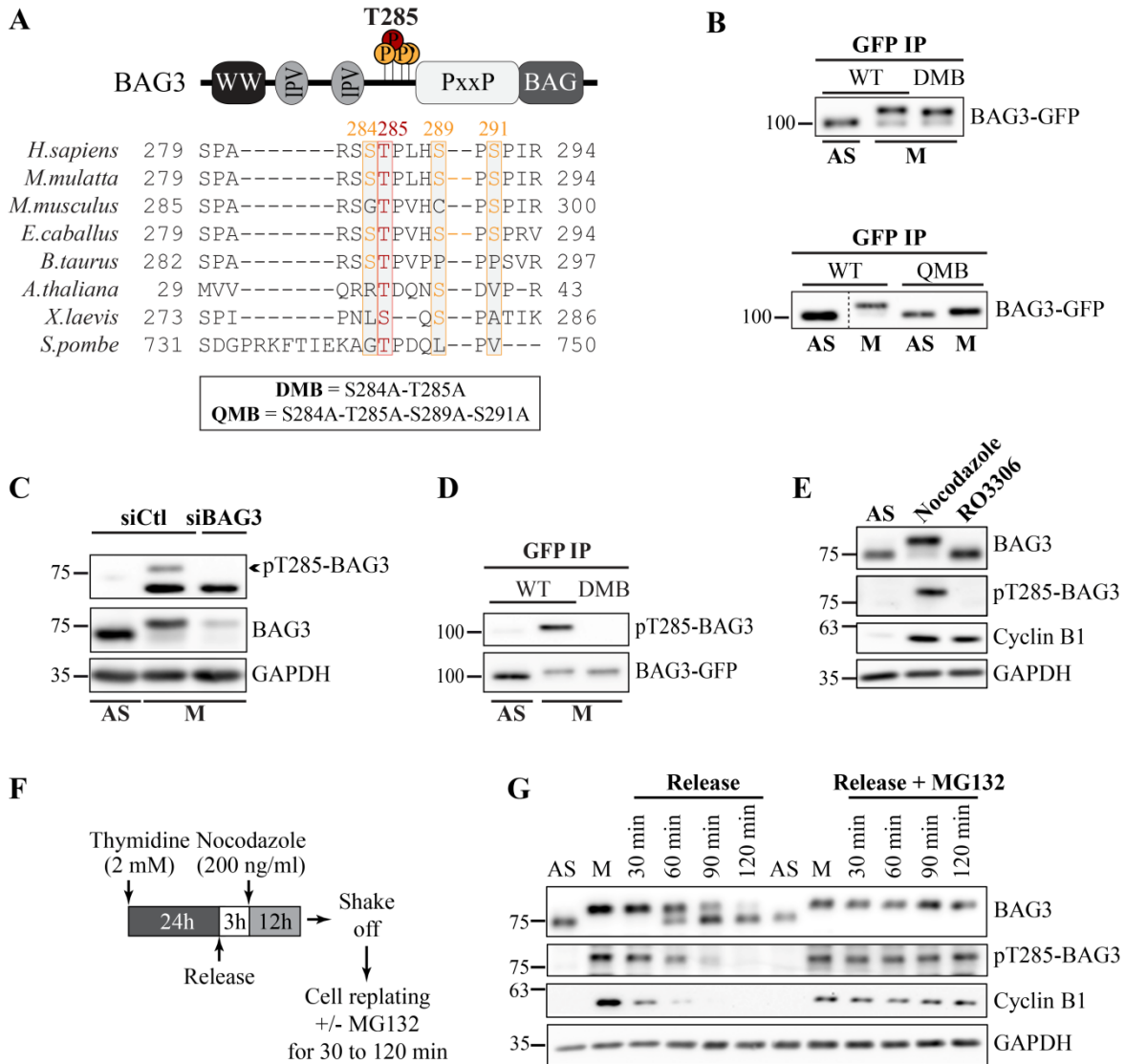


Figure 2.1: BAG3 is phosphorylated at T285 residues at early mitosis. (A) Schematic representation of BAG3 modular domains and phosphorylated residues identified by AP-MS analyses. Sequence alignments show the interspecies conservation of the phosphorylated motif. Double mutant BAG3 (DMB) and quadruple mutant BAG3 (QMB) were generated and used in this study (box). (B) Western blots of BAG3-GFP IPs prepared from HeLa-RFP-H2B cells growing asynchronously (AS) or arrested in mitosis by nocodazole (M) and recovered by a mitotic shake off, showing that the mitotic mobility shift of BAG3-GFP mutants (DMB, QMB) is decreased relative to that of the wild type BAG3-GFP (WT). Cells were transfected with BAG3-specific siRNA (targeting the 3'UTR) and BAG3-GFP proteins were introduced by transduction of recombinant adenoviruses. IP and immunoblotting were performed using anti-GFP. (C) Representative Western blots of HeLa cell extracts that have been transfected with control or BAG3-specific siRNAs (siBAG3#1), showing the specificity of the anti-pT285-BAG3 that reacts to endogenous BAG3 in mitotic cells (M: nocodazole-arrested cells recovered by mitotic shake off; AS: asynchronous cells); the levels of total BAG3 and GAPDH (loading control) are shown. (D) BAG3-GFP IPs were prepared using anti-GFP from asynchronous (AS) or from mitotic HeLa-RFP-H2B cells synchronized by nocodazole and recovered by mitotic shake off, after transduction of recombinant adenoviruses driving expression of WT or DMB BAG3 mutant;

Western blotting was performed using anti-GFP or anti-pT285-BAG3 antibodies. (E) Extracts were prepared from asynchronous (AS) or from mitotic HeLa-RFP-H2B cells synchronized in early mitosis by nocodazole arrested at the G2/M border by the CDK1 inhibitor RO3306. Western blots were performed using the indicated antibodies to endogenous proteins; GAPDH: loading control. The data are representative of 5 experiments. (F) Schematic of the protocol used. Early mitotic HeLa-RFP-H2B cells were recovered by mitotic shake off and seeded on poly-L-lysine-coated dishes in fresh medium, with or without MG132 (5 μ M) to inhibit mitotic exit. Cells were collected at different times and extract were analyzed by Western blots using the indicated antibodies; GAPDH: loading control. The results are representative of 3 independent experiments.

To test the contribution of these 3 phosphorylation sites to the mitotic mobility shift of BAG3, we used BAG3-GFP proteins bearing substitutions of T285, S289, S291 to alanines, either individually or in combinations; we also mutated S284 that could be phosphorylated in mitotic cells (Fig. S2.1E; PhosphoSite Plus database). The BAG3-GFP proteins were expressed in HeLa cells by transduction of recombinant adenoviruses [12, 49]. They were immunopurified and their mobility was then analyzed on SDS-PAGE by immunoblotting with an anti-GFP antibody. As shown in Figure 2.1B, the majority of wild type BAG3-GFP displayed a marked mobility shift in mitotic cells that were recovered by a mitotic shake off (M), as compared to asynchronous cells (AS). Under these conditions, mutation of S284 and T285 induced a modest reduction of BAG3 mobility shift in mitotic cells (Fig. 2.1B, DMB), which was further enhanced by the simultaneous mutation of S289 and S291 (Fig. 2.1B, QMB). These results indicate that the identified phosphorylation sites account in part for BAG3 mobility shift at mitotic entry.

To validate phosphorylation of BAG3 at the highly conserved T285, we generated a phospho-specific antibody against a T285-phosphorylated peptide of BAG3 (CGSPARSS[pT]PLHS). The pT285-BAG3 antibody detected a mitotic-specific band in total cell lysates from HeLa-RFP-H2B cells, which was reduced upon transfection of cells with BAG3-specific siRNAs (Fig. 2.1C). Moreover, the antibody recognized wild type BAG3-GFP but did not react to a mutant BAG3-GFP protein that lacks T285 upon immunoprecipitation from mitotic HeLa cells, confirming the specificity of the anti-pT285-BAG3 antibody (Fig. 2.1D, DMB). We further detected T285-phosphorylated BAG3, like the supershifted band of BAG3, in HeLa cells that have been arrested in mitosis by a nocodazole treatment (Fig. 2.1E). In contrast, both signals were absent in cells arrested at the G2/M border by treatment with the specific CDK1 inhibitor RO3306 (Fig. 2.1E). Rather, T285-phosphorylated BAG3 levels peaked in mitotically-arrested cells and gradually decreased as the cells were released in mitosis and progressed to anaphase, in parallel to cyclin B1 degradation (Fig. 2.1G). Though, the levels of T285-phosphorylated BAG3, like cyclin B1 levels, were maintained for prolonged periods of time when mitotic exit was inhibited by treatment with MG132

that blocks cyclin B1 degradation (Fig. 2.1G, release + MG132)[53]. We concluded that T285 is a mitotic phosphorylation site on BAG3.

2.5.2. BAG3 phosphorylation at T285 is regulated by CDK1

Computational analyses revealed that T285 and the other BAG3 phosphorylation sites identified in our AP-MS analyses are candidate target sites for CDK1; in support, the same sites were recently identified as candidate CDK1 substrates by quantitative phosphoproteomics analyses in HeLa cells [54]. To formally test the dependence of BAG3 phosphorylation on various mitotic kinases, HeLa-RFP-H2B cells were arrested at mitotic entry by a thymidine/nocodazole block to promote maximal BAG3 phosphorylation, and were then treated with pharmacological inhibitors of the major mitotic kinases for an additional 1 h-treatment, including RO3306 (CDK1), purvanolol A (pan-CDKs), MLN8237 (Aurora A) and BI2536 (PLK1) (Fig. 2.2A, schematic of the protocol used) [55-57]. This experimental design enabled us to address direct effects on the dynamics of BAG3 phosphorylation, rather than indirect changes due to modifications of the mitotic index (Fig. S2.2A). Under these conditions, the CDK inhibitors purvanolol A and RO3306 completely abolished BAG3 mobility shift and its phosphorylation at T285 (Fig. 2.2A, S2.2B). In contrast, similar treatments with MLN8237 or BI2536 only partially decreased, or had no detectable impact on T285-phosphorylated levels, respectively, despite that they were able to interfere with the progression of cells through mitosis after prolonged exposure (Fig. S2.2A). These results suggest that sustained CDK1 activity is required to maintain BAG3 phosphorylation at T285 during mitosis.

To determine if BAG3 is a substrate of CDK1, we performed an *in vitro* kinase assay using bacterially expressed recombinant GST-BAG3 and active CDK1 complex in the presence of ³²P [ATP]. Under these conditions, we observed a dose-dependent phosphorylation of GST-BAG3 and of the positive control histone H1; however, no phosphorylation was detected with the negative control GST alone (Fig. 2.2B). Immunoblotting of the CDK1-phosphorylated GST-BAG3 after a cold *in vitro* kinase assay using the anti-pT285-BAG3 antibody confirmed that T285 was modified by CDK1 (Fig. 2.2C). To determine if there was a BAG3-CDK1 interaction during mitosis, we performed coimmunoprecipitation in HeLa-Flp-In T-Rex cells expressing BAG3-GFP, growing asynchronously (AS) or synchronized in mitosis with nocodazole (M). The association of BAG3 with CDK1 and p62, a mitotic BAG3 partner [12], was analyzed by immunoblotting the BAG3-GFP immune complexes. As shown in Figure 2.2D, an association between BAG3-GFP and active CDK1 (not phosphorylated on the inhibitory Y15) was clearly detected in mitotic cells along

with the enhanced binding of BAG3 to p62, as previously shown [12, 58]. Altogether, these results show that BAG3 is directly phosphorylated by CDK1 at T285 at early mitosis, when CDK1 activity is maximal.

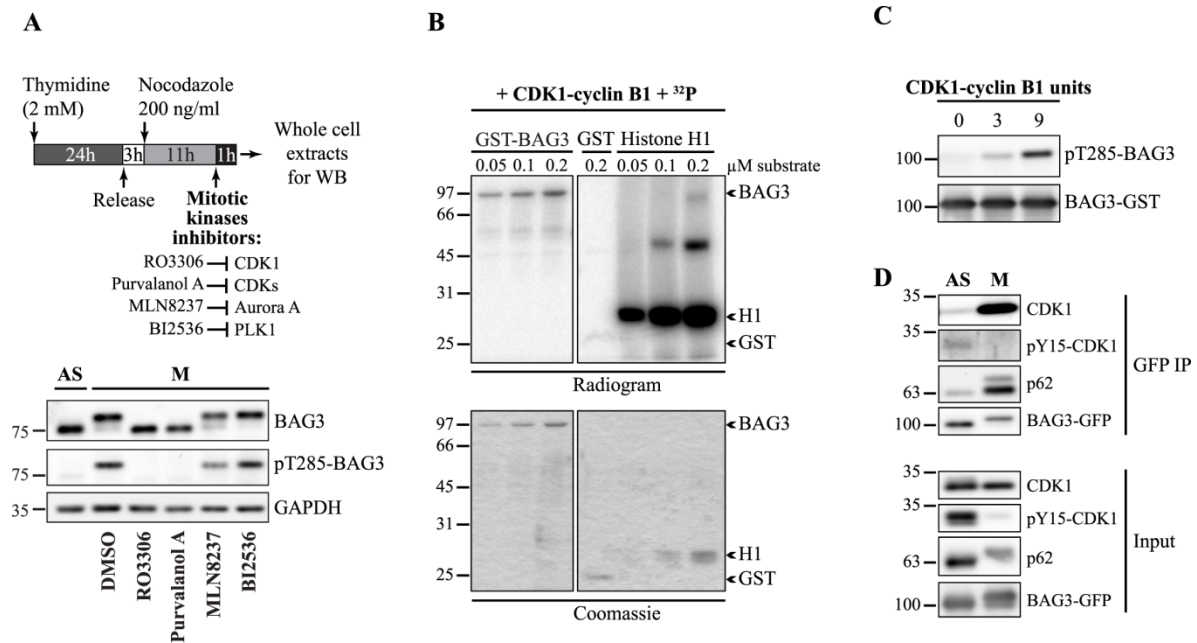


Figure 2.2: Regulation of BAG3 phosphorylation at T285 by CDK1. (A) Schematic of the protocol used. Extracts were prepared from mitotic HeLa-RFP-H2B incubated for 1 h in the presence of chemical inhibitors to the following kinases: RO3306 (CDK1, 8 μM), Purvalanol A (CDKs, 10 μM), MLN8237 (Aurora A, 1 μM), and BI2536 (PLK1, 1 μM) or the vehicle only, and collected by mitotic shake off. Immunoblotting was performed using the indicated antibodies; GAPDH: loading control. The data represent 4 to 8 experiments. (B) Autoradiogram showing phosphorylation of recombinant GST-BAG3 by purified CDK1-cyclin B1 complex, in the presence of ³²P-ATP; Histone H1 and GST were used as positive and negative controls, respectively. The data are representative of 2 independent experiments. (C) GST-BAG3 was phosphorylated *in vitro* by CDK1-cyclin B1 and analyzed by Western blot using the phospho-specific anti-BAG3; the total levels of GST-BAG3 are shown. The data represent 2 experiments. (D) BAG3-GFP IPs were prepared using anti-GFP from asynchronous (AS) or mitotic HeLa-Flp-In-T-Rex-WT (nocodazole-arrested) transfected with BAG3-specific siRNA (3'UTR, siBAG3#3, 48 h) and treated with doxycycline to induce BAG3-GFP expression (1 ng/ml, 16 h). They were analyzed by Western blots using the indicated antibodies; the levels of CDK1, pY15-CDK1 (inactive), p62, and BAG3-GFP in total cell extracts are shown (Input). The data represent 5 independent experiments.

2.5.3. BAG3 phosphorylation mutants cannot rescue the mitotic defects in cells depleted of BAG3.

We next sought to determine the dependence of the mitotic function of BAG3 for its phosphorylation by CDK1. To this end, we performed depletion-rescue experiments using wild type BAG3-GFP, or BAG3-GFP phosphorylation mutants bearing alanine substitution at T285 (and at S284 to avoid compensatory phosphorylation; DMB) or at all the identified phosphorylated sites

(S284, T285, S289, S291; QMB), compared to a BAG3-GFP mutant containing a phospho-mimetic mutation at T285 (T285D). Using recombinant adenoviruses, the BAG3-GFP mutants were expressed at similar levels in HeLa-RFP-H2B cells that have been depleted of endogenous BAG3 by transfection with siRNA duplex targeting the 3' untranslated region of BAG3 (Fig. 2.3A)[49].

We first determined the functional impact of BAG3-GFP mutants on spindle dynamics by expressing low levels of RFP- α -tubulin in these cells. Live cell imaging in BAG3-depleted cells recapitulated the mitotic defects that was characterized before, i.e. spindle rocking, delay at prometaphase/metaphase [12]. Under these conditions, expression of wild type (WT) BAG3-GFP in BAG3-depleted cells, but not of GFP, could restore to near normal the progression through early mitosis, bringing the level of phenotypic defects in line with control cells (Fig. 2.3B, Fig. 2.3C, red bar; S1 Movie, S2 Movie, S3 Movie). In sharp contrast, none of the non-phosphorylatable BAG3-GFP mutants, nor the phospho-mimetic BAG3-GFP mutant, could restore the mitotic defects in BAG3-depleted cells (Fig. 2.3B, 2.3C, S2.3 Movie, S4 Movie, S5 Movie).

Next, we monitored the impact of BAG3-GFP mutants on mitotic rounding, as failure to properly round up at mitotic entry has been associated with defects in spindle orientation in BAG3-depleted cells [12]. As expected, there was a significant increase in the proportion of BAG3-depleted cells that failed to round up at mitotic entry relative to cells transfected with control siRNA, a phenotype that could be corrected by expression of wild type BAG3-GFP (Fig. 2.4D; 2.4E, red bar). However, neither the non-phosphorylatable BAG3-GFP (DMB) nor the phospho-mimetic BAG3-GFP mutant (T285D) were able to efficiently restore mitotic rounding in BAG3-depleted cells (Fig. 2.3D, S284A-T285A; 2.3E). In marked contrast, the non-phosphorylatable BAG3-GFP mutants could restore aggresome-targeting of ubiquitinated protein micro-aggregates in BAG3-depleted cells that have been treated with the proteasome inhibitor MG132, confirming their functionality for other BAG3-dependent activities during stress (Fig. S2.3A). Indeed, both the non-phosphorylatable DMB and the phospho-mimetic T285D BAG3-GFP mutants were able to restore HSPB8 expression levels in cells depleted of BAG3, suggesting that the mutations did not affect the chaperone complex assembly, which stabilizes BAG3 and HSPB8 levels during mitosis (Fig. 2.5F) [12, 50]. We concluded that BAG3 phosphorylation is required during mitosis to regulate its function in mitotic rounding and spindle orientation.

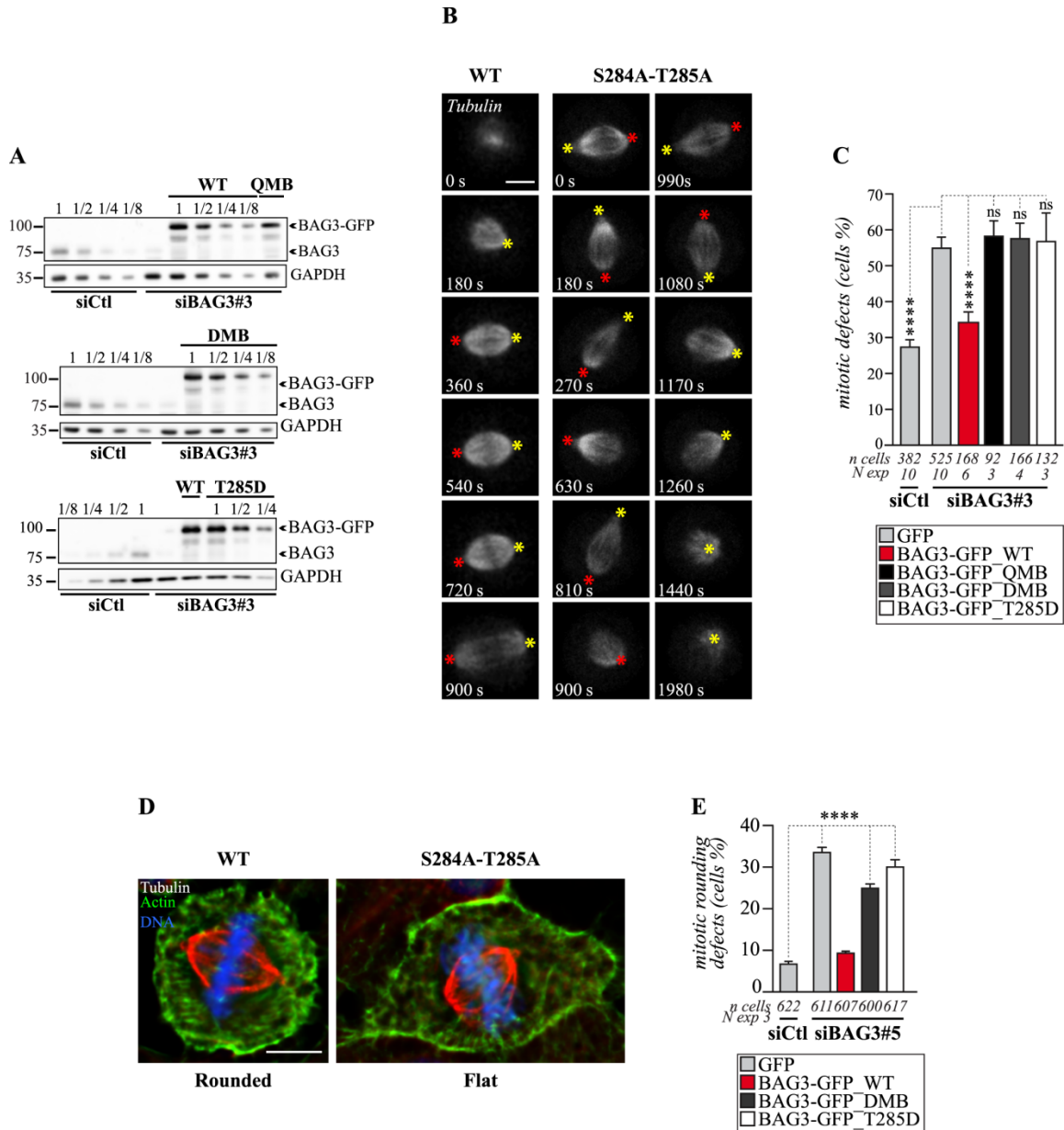


Figure 2.3: The non-phosphorylatable and phospho-mimetic BAG3-GFP mutants cannot rescue spindle dynamics and mitotic rounding in BAG3-depleted cells. Depletion-rescue experiments were performed in HeLa-RFP-H2B transfected with siBAG3#3 or control siRNA and transduced with recombinant adenoviruses driving expression of BAG3-GFP proteins; cells were synchronized in mitosis by the double thymidine block method. **(A)** Total cell extracts were analyzed by Western blots using anti-BAG3 and anti-GAPDH; the levels of endogenous BAG3 depletion (>75% reduction) and exogenous BAG3-GFP protein levels were estimated by loading increasing amounts of control extracts (siCtl), or from extracts of BAG3-depleted cells transduced with Ad-BAG3-GFP, respectively. **(B)** Representative spinning disk confocal time-lapse sequences of cells from (A) that have been transduced with BacMAM-RFP- α -tubulin to analyze spindle dynamics, showing restoration of proper spindle dynamics in BAG3-depleted cells upon reintroduction of WT, but not phosphorylation BAG3 mutant (S284A-T285A); red and yellow asterisks designate the position of spindle poles; Bar : 10 μ m. **(C)** Quantification of cells from (A) indicating the percentages of cells with abnormal mitosis defined as spindle rocking or stalled in mitosis +/- spindle rocking; means +/- SE of 92 to 525 cells from at least 3 independent experiments (S1 Dataset). Statistical significance was analyzed with the Fisher

Exact Test and ****: $p < 0.0001$, compared siBAG3#3 + GFP to siCtl + GFP and siBAG3#3 + BAG3-GFP_WT; ns = 0.6502 compared siBAG3#3 + BAG3-GFP_WT and siBAG3 + S284A-T285A-S289A-S29A; ns = 0.7885 compared siBAG3#3 + BAG3-GFP_WT and siBAG3 + S284A-T285A and ns = 0.2805 compared siBAG3#3 + BAG3-GFP_WT and siBAG3 + T285D. Please refer to S1–S6 movies for representative samples of the phenotypes observed. **(D)** Deconvolved epifluorescence images showing a round mitotic cell at metaphase (siCtl) compared to a flat mitotic cell at metaphase (siBAG3#5); F-actin and DNA were stained using phalloidin (green) and Hoechst (blue), Bar: 10 μm . **(E)** Graph depicting the percentages of cells with mitotic rounding defects; means \pm SE of 600 to 622 cells from 3 independent experiments. Statistical significance was analyzed by the Fisher Exact Test and ****: $p < 0.0001$ compared siCtl + GFP to siBAG3_1 + GFP, siBAG3_1 + S284A-T285A and siBAG3_1 + T285D; n.s, $p = 0.1929$ compared siCtl + GFP and siBAG3_1 + WT.

2.5.4. The regulation of BAG3 and p62 by CDK1 shows mutual dependence.

Our previous work supports the existence of a tertiary complex formed by BAG3-HSPB8-p62 in mitotic cells of functional relevance for the remodeling of actin-based structures that guide spindle orientation [12]. Because p62 has been identified by others as a bona fide target of CDK1 at mitotic entry, we next sought to investigate a potential connection between BAG3 and p62 mitotic phosphorylation [59]. We first performed coimmunoprecipitation analyses in mitotic cells to assess the molecular requirements on BAG3 that are required for its association with CDK1 and/or p62. BAG3-GFP mutants that lack functional domains required for its mitotic function were expressed in HeLa cells; these include the IPV motifs, which mediate binding to the small chaperone HSPB8 [60], and the PXXP motif, the deletion of which can inhibit BAG3 mitotic activity [12]. We found that deletion of the PXXP motif on BAG3 markedly impaired its ability to associate with both CDK1 and p62 (Fig. 2.4A, Δ PXXP). The BAG3-GFP (IPV) mutant, which was defective in HSPB8 binding, also showed a reduced ability to associate with CDK1 and p62 relative to wild type BAG3-GFP (Fig. 2.4A, IPV). These results suggest that BAG3 associations with CDK1 and p62 depend on the same structural requirements.

We next examined the dependence of BAG3 mitotic phosphorylation for p62, which directly interacts with CDK1 [59]. HeLa cells were treated with p62-specific siRNAs and the levels of T285-phosphorylated BAG3 was analyzed by immunoblotting with the anti-pT285-BAG3 antibody. Remarkably, depletion of p62 reduced BAG3 phosphorylation, an effect which was reminiscent of that seen upon depleting HSPB8 (Fig. S2.3B) [12]. These results were consistent with the existence of a tertiary complex between BAG3, HSPB8 and p62 that could facilitate BAG3 phosphorylation at mitotic entry.

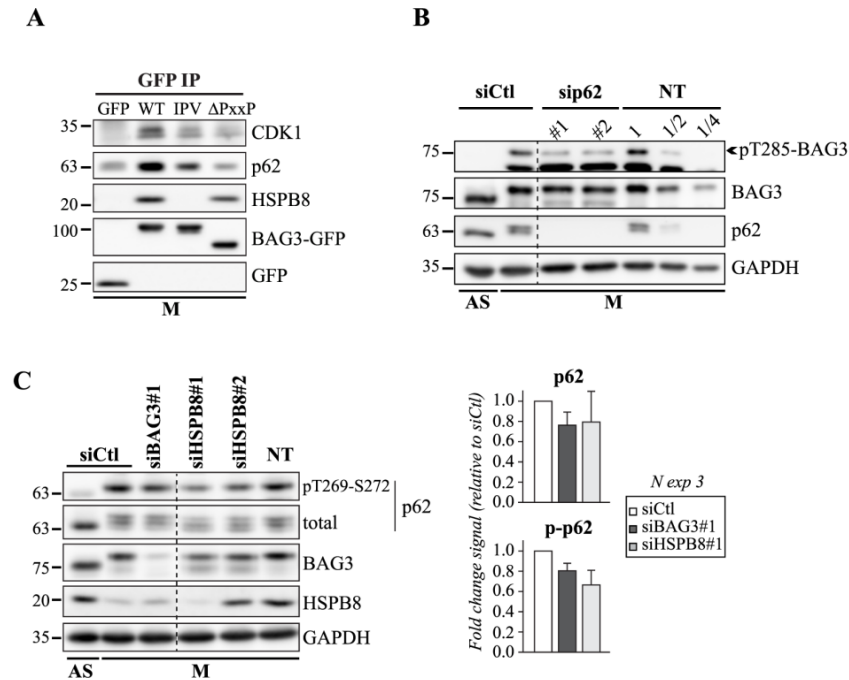


Figure 2.4: Regulation of BAG3 and p62 by CDK1 shows mutual dependence. (A) BAG3-GFP IPs were prepared using anti-GFP from mitotic HeLa-RFP-H2B cells transduced with recombinant adenoviruses driving the expression of wild type (WT) BAG3-GFP or mutants defective in HSPB8 binding (IPV) or bearing deletion of PXXP motifs; cells were synchronized in early mitosis by nocodazole and collected by mitotic shake off. Immunoblotting was performed using anti-p62, anti-HSPB8 and anti-GFP antibodies. (B) Western blots of extracts prepared from asynchronous (AS) or from mitotic HeLa cells (M) synchronized in early mitosis by nocodazole and collected by mitotic shake off; cells were transfected or not (NT) with control siRNA (siCtl) or p62-specific siRNAs (sip62) and the levels of T285-phosphorylated BAG3, total BAG3, p62 and GAPDH (loading control) are shown. (C) Western blots of extracts prepared from asynchronous (AS) or from mitotic HeLa cells (M) synchronized in early mitosis by nocodazole and collected by mitotic shake off; cells were transfected or not (NT) with control siRNA (siCtl) or BAG3-specific siRNA (siBAG3) or HSPB8-specific siRNAs and the levels of proteins as indicated are shown. Graphs depict the fold change in total p62 levels (p62) or in T269-S272-phosphorylated p62 levels (p-p62) that was calculated relative to cells transfected with control siRNA and normalized relative to GAPDH levels; means \pm SE from 3 independent experiments.

We then sought to analyze a reciprocal effect of BAG3 and HSPB8 on the mitotic phosphorylation of p62. We have shown recently that during proteasomal stress, depletion of BAG3 or HSPB8 interferes with accurate modifications of p62 and mounting of an efficient stress response [41]. We reasoned that BAG3-HSPB8 could similarly act as a chaperone complex to facilitate p62 phosphorylation at mitotic entry. To test this idea, HeLa cells were treated with BAG3- or HSPB8-specific siRNAs and the level of p62 phosphorylated at the sites modified by CDK1, T269-S272, were analyzed by immunoblotting [59]. As shown in Figure 2.4C, the levels of p62 phosphorylated at T269-S272, like whole p62 levels, tended to be reduced in cells depleted of BAG3 or HSPB8; while these trends were reproducible, the reductions were not statistically significant. Altogether,

these results suggest that assembly of a BAG3-HSPB8-p62 tertiary complex is meaningful for BAG3 and p62 mitotic functions and likely facilitates their phosphorylation by CDK1.

2.5.5. BAG3 phosphorylation regulates the molecular assembly of p62 bodies at mitotic entry

The molecular assembly of p62 oligomers into high ordered inclusion bodies is a key process that determines the functions of p62 in protein sequestration, autophagosome assembly and cytoprotective signaling [61-68]. Cellular inclusions are believed crucial to orchestrate spatial protein quality control (PQC), to segregate and sequester damaged or superfluous proteins. They also emerged as dynamics cellular platforms to coordinate cell signaling and PQC mechanisms during physiological processes [3, 4, 69]. Phosphorylation of p62 at S349 and S403 has been shown to increase p62 binding to ubiquitinated proteins and promote the formation of p62 bodies during various stresses, a process that is regulated by BAG3-HSPB8 [41, 70]. As yet, however, the localization and organization of mitotically-phosphorylated p62 is unknown. Having shown a functional connection between BAG3 and p62 phosphorylation by CDK1, we next sought to explore the mechanisms whereby BAG3 phosphorylation regulates mitotic cell remodeling by investigating whether BAG3 and HSPB8 could modulate the molecular assembly of p62 bodies at mitotic entry.

To that end, we first analyzed the subcellular distribution of p62 and ubiquitinated proteins in normally growing HeLa cells, by immunostaining endogenous p62 and poly-ubiquitine (Ub). Remarkably, cells undergoing an unperturbed mitosis exhibited a marked increase in Ub-labelled p62 clusters relative to interphase cells (Fig. 2.5A, arrowhead; Fig. 2.6D, compare AS to metaphase). These p62 clusters were designated *mitotic inclusion body structures*: MIBS, and as expected, they were downregulated by silencing of p62 (Fig. 2.5B, sip62). Importantly, MIBS-containing p62 was phosphorylated at mitotic sites (T269-S272), but not at the canonical stress-induced site S403 (Fig. 2.5C)[59, 70]. This suggests that MIBS are mitotically-regulated structures, and not canonical stress-induced p62 bodies.

To assess the impact of BAG3 and HSPB8 on MIBS formation, parental HeLa cells or HeLa-RFP-H2B cells were treated with BAG3- or HSPB8-specific siRNAs. MIBS formation was then analyzed quantitatively in cells undergoing an unperturbed mitosis (at the prometaphase/metaphase stages) by immunostaining endogenous p62. Using various siRNA sequences, we found that

depletion of either BAG3 or HSPB8 had a profound impact on MIBS formation, reducing their number by ~2- to 6-folds in cells at the prometaphase/metaphase stages (Fig. 2.5D). Importantly, the efficiency of MIBS formation could be restored by introducing wild type BAG3-GFP, but not GFP or a non-phosphorylatable BAG3-GFP mutant (QMB) in BAG3-depleted cells, using recombinant adenoviruses (Fig. 2.5E).

Overexpression of BAG3 was associated with inclusion formation [39]. To better limit the expression of exogenous BAG3-GFP proteins at near the endogenous levels of BAG3 in our rescue experiments, we engineered inducible isogenic cell lines using HeLa-Flp-In T-Rex cells [71]. Using this system, BAG3-GFP wild type and mutants were induced at slightly lower levels compared to endogenous BAG3 upon addition of low amounts of doxycycline (Fig. 2.5F). Under these conditions, induction of the wild type BAG3-GFP could partially but significantly correct the defect in MIBS formation caused by BAG3 depletion, confirming its requirement (Fig. 2.5G, WT). Nonetheless, neither the non-phosphorylatable nor the phospho-mimetic mutants could promote MIBS formation in BAG3-depleted cells, despite that were able to restore HSPB8 levels in these cells (Fig. 2.5G, DMB, T285D). Thus, these results establish a role for the mitotic phosphorylation of BAG3 in the molecular assembly of p62 into MIBS.

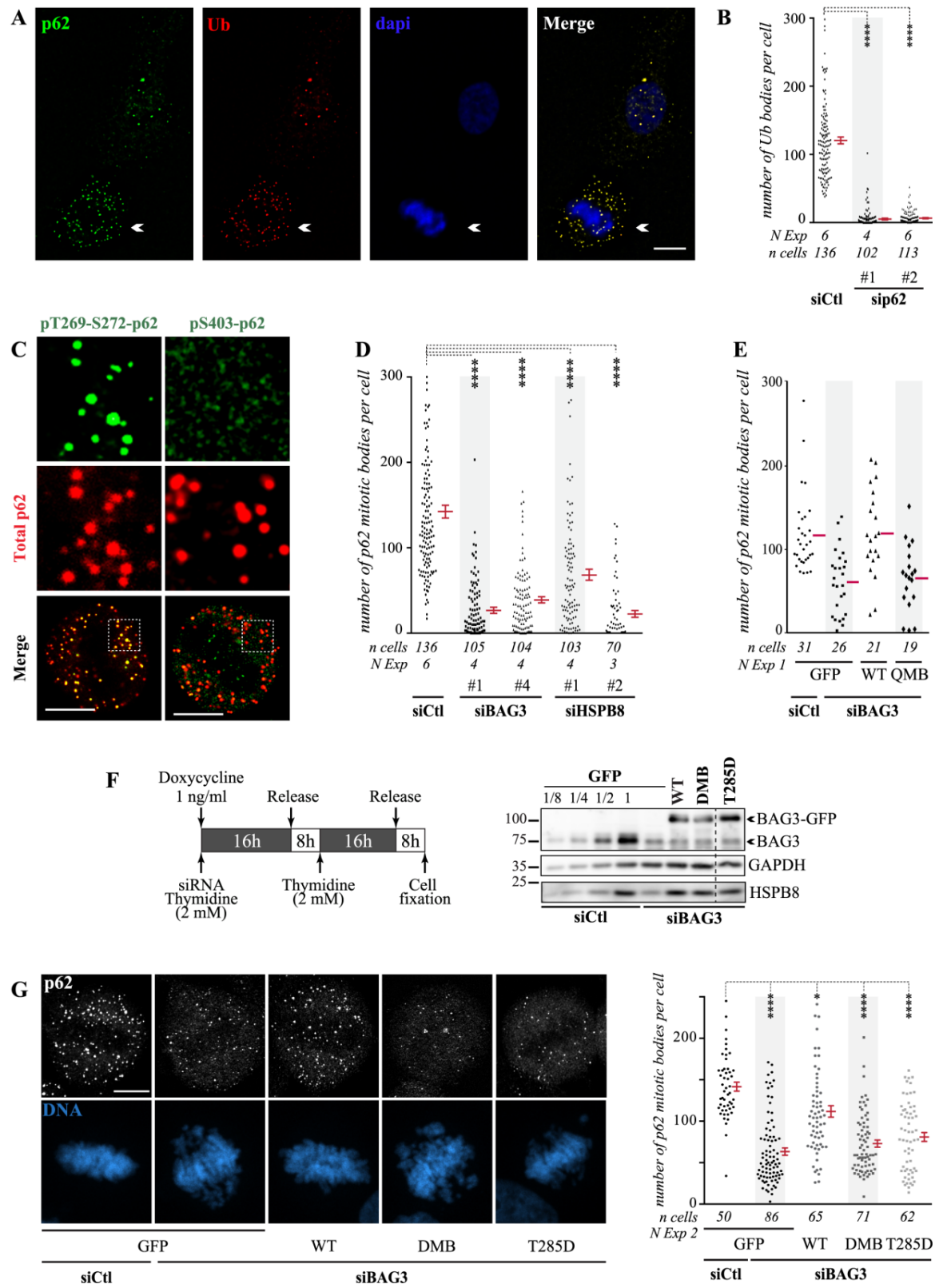


Figure 2.5: The molecular assembly of p62 into MIBS depends on BAG3 phosphorylation and HSPB8. (A) Deconvolved epifluorescence images showing the co-distribution of endogenous p62 and polyubiquitin

staining in a cell undergoing an unperturbed mitosis (white arrowhead) compared to an interphase cell; DNA was stained with Hoechst, Bar: 10 μm . **(B)** Quantification of polyubiquitin clusters in HeLa cells at the prometaphase-metaphase stages during an unperturbed mitosis; cells were transfected with control siRNA or p62-specific siRNAs and stained using anti- α -tubulin and anti-ubiquitin antibodies, means \pm SE from 102 to 136 cells from at least 4 independent experiments. Statistical significance was analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons: ****, $p < 0.0001$. **(C)** Deconvolved single plan confocal images of HeLa cells at metaphase (unperturbed) showing staining of T269-S272-phosphorylated p62, S403-phosphorylated p62 and total p62; Bars: 10 μm . **(D, E)** Quantification of HeLa cells at prometaphase-metaphase stages transfected with control siRNA (siCtl), BAG3-specific siRNAs or HSPB8-specific siRNAs, indicating the numbers of mitotic p62 bodies per cell, means \pm SE from 70 to 136 cells from at least 3 independent for (D; unperturbed mitotic cells); statistical significance was analyzed with the Kruskal-Wallis test: ****: $p < 0.0001$. Cells were stained for endogenous p62, α -tubulin and DNA. Statistical significance was analyzed with the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons : ****: $p < 0.0001$ (E) Wild type or quadruple phosphorylation mutant of BAG3-GFP were introduced in BAG3-depleted cells using recombinant adenoviruses and cells were synchronized by a double thymidine block, means \pm SE from 19 to 31 representative cells. **(F)** Schematic of the protocol used for depletion-rescue analyses of MIBS assembly in HeLa-Flp-In-T-Rex cell lines. Western blots of extracts from cells treated with BAG3-specific siRNA (3'UTR) and doxycycline (1 ng/ml, 16 h) show levels of wild type or BAG3-GFP mutants compared to levels of endogenous BAG3 that were estimated by loading increasing amounts of untreated HeLa Flp-In-T-Rex cells (1, 1/2, 1/4, 1/8); the levels of HSPB8 and GAPDH (loading control) are shown. **(G)** Confocal image stacks of mitotic HeLa Flp-In-T-Rex cells expressing GFP as control, or the indicated BAG3-GFP proteins treated as in (F), and immunostained for p62, DNA (Hoechst) and β -tubulin (spindle, not shown); Bar: 10 μm . Cells were synchronized in mitosis with the double thymidine block method and BAG3-GFP proteins were induced during the first thymidine block with doxycycline (1 ng/ml, 16 h). The graph depicts the numbers of mitotic p62 bodies per cell, means \pm SE from 50 to 86 cells from 2 representative experiments; statistical significance was analyzed with the Kruskal-Wallis test:****, $p < 0.0001$.

2.5.6. MIBS are high-ordered structures containing K63 polyubiquitin chains, which are modulated by CDK1

So far, the data indicated that MIBS are assembled during an unperturbed mitosis, in a manner that requires HSPB8 and mitotically-phosphorylated BAG3. MIBS were detected in different proliferative cell types, including parental HeLa cells and normal mouse myoblasts cells (C2C12 cells), suggesting that they generally respond to mitotic signals (Fig S2.4). We observed that MIBS dynamically changed during mitosis, forming clusters that increased in size and numbers from prophase to metaphase, after which they seemed to dissociate (Fig. 2.6A, 2.6B). These results suggest that MIBS are mitotically-regulated cellular inclusions.

To further explore the role of CDK1 in MIBS assembly, HeLa cells were treated with low doses of the CDK inhibitor RO3306 as they were released from a double thymidine block to downmodulate CDK1 while enabling cells to enter mitosis. Under these conditions, treatment of cells with 1 to 3 μM RO3306 had no major effect on the mitotic index; however, cells exhibited marked delays in mitosis and accumulated at the prometaphase/metaphase and prophase stages, consistent with a partial inhibition of CDK1 (Fig. 2.5C) [72]. Nonetheless, in cells that reached the metaphase stage,

the numbers of MIBS were significantly reduced relative to control metaphase cells (Fig. 2.6B, RO3306). These results suggest that the dynamics of MIBS is regulated by CDK1 activity.

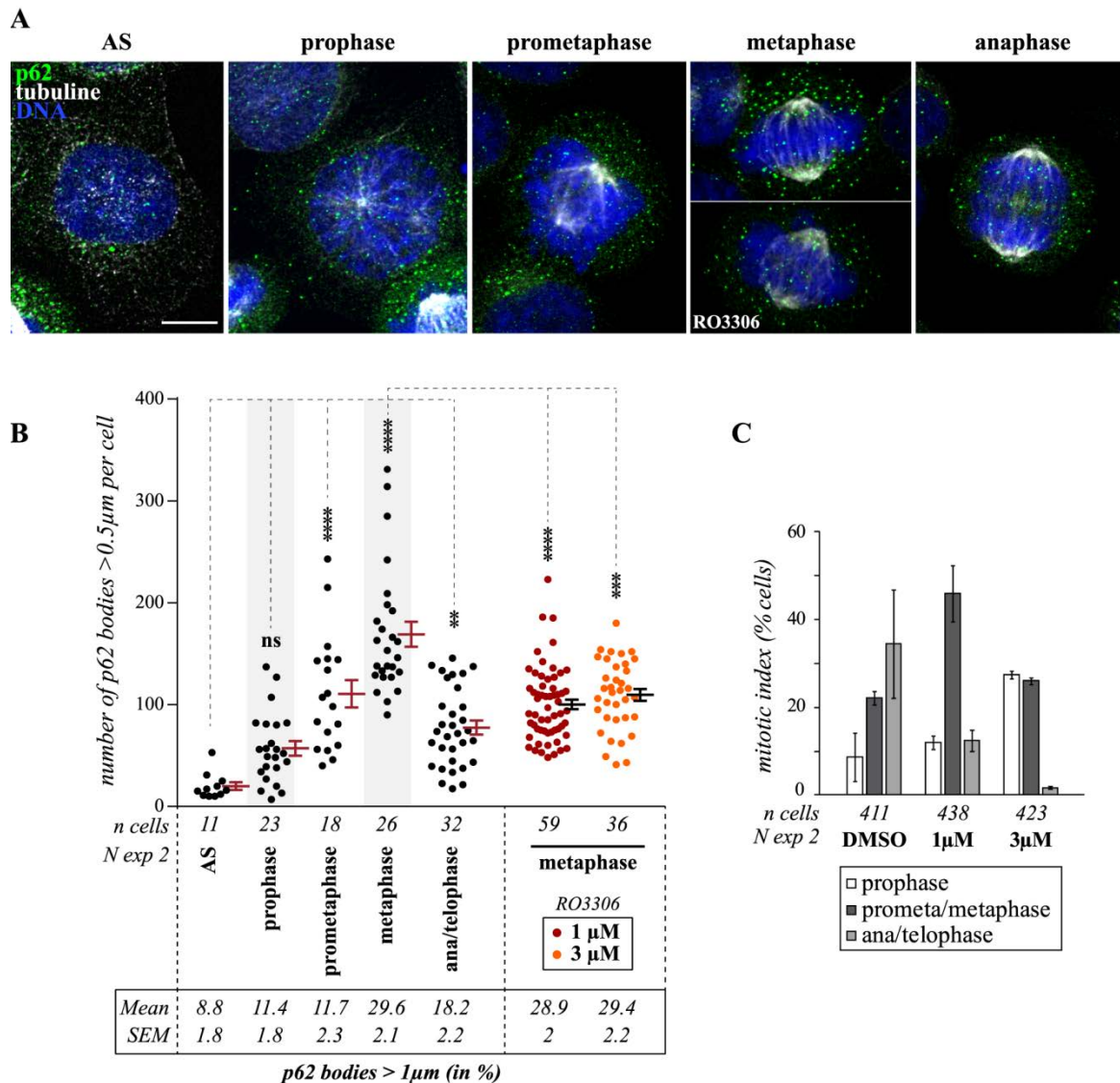


Figure 2.6: MIBS' numbers and size change during mitosis and their assembly is regulated by CDK1. (A) Merged plane images from confocal stacks of representative HeLa-RFP-H2B cells synchronized in mitosis by a double thymidine block, showing immunostaining of MIBS with anti-p62, mitotic spindle with anti-β-tubulin and DNA staining with Hoechst, Bar: 10 μm.; cells were treated or not with low doses of the CDK1 inhibitor RO3306 for 3 h before cell fixation. (B) Quantification of cells from (A), indicating the numbers of p62 bodies per cell at the indicated stages of mitosis, means +/- SE from 11 to 59 cells from 2 representative experiments. Statistical significance was analyzed with the Kruskal-Wallis test: ****: p<0.0001; ***: 0.003 compares metaphase + DMSO vs metaphase RO3306; **: p = 0.0042 compares AS vs anaphase/telophase; ns compares AS vs prophase. (C) Quantification of cells from (A), showing the percentages of cells treated with RO3306 or the vehicle (DMSO) at the indicated stages of mitosis, means +/- SE from 411 to 438 cells from 2 representative experiments.

We next sought to further explore the structure of MIBS. The propensity of p62 to form clusters was shown to depend on polyubiquitin binding and the ubiquitin chain type, K63-linked ubiquitin chains being a preferred substrate [73-75]. Immunostaining indeed revealed that MIBS recruited high levels of K63 polyubiquitin chains compared to p62 bodies from interphase cells HeLa cells (Fig. 2.7A, compare M to I). To determine if K63 polyubiquitin chains were stable components of MIBS, we performed coimmunoprecipitation analyses. Intriguingly, K63 polyubiquitin chains were barely detectable in p62 immunoprecipitate (IP), suggesting that cell lysis could disrupt weak interactions between p62 and K63 polyubiquitin chains. In agreement, high molecular weight K63-linked ubiquitin signals were recovered in p62 IP prepared from DTME cross-linked cells (Fig. 2.7B) or from formaldehyde cross-linked cells (data not shown). These data suggest that K63 polyubiquitin chains-containing proteins are dynamics components of MIBS. We then refined the analysis of MIBS substructure by performing gated 3D STED imaging of endogenous p62 and K63 polyubiquitin chains in HeLa cells undergoing an unperturbed mitosis. The images from Z-stacks revealed co-labelled structures of different sizes. Small assemblies tended to adopt a spherical shape whereas larger structures were cup-shaped with diameters of ~200 nm to ~1.5 μ m, showing a dense core of p62 (Fig. 2.7C, red signal). Regions of overlapping staining between p62 cores and K63 polyubiquitin chains were readily discernable; in particular, K63 polyubiquitin chains appear to form a “shell” around the neck of p62 structures (Fig. 2.7C, green signal). Similar arrangements of p62 and K63 polyubiquitin chains were observed by single color gated STED imaging. These results suggest that MIBS are specific high-ordered structures that recruit K63 polyubiquitin chains.

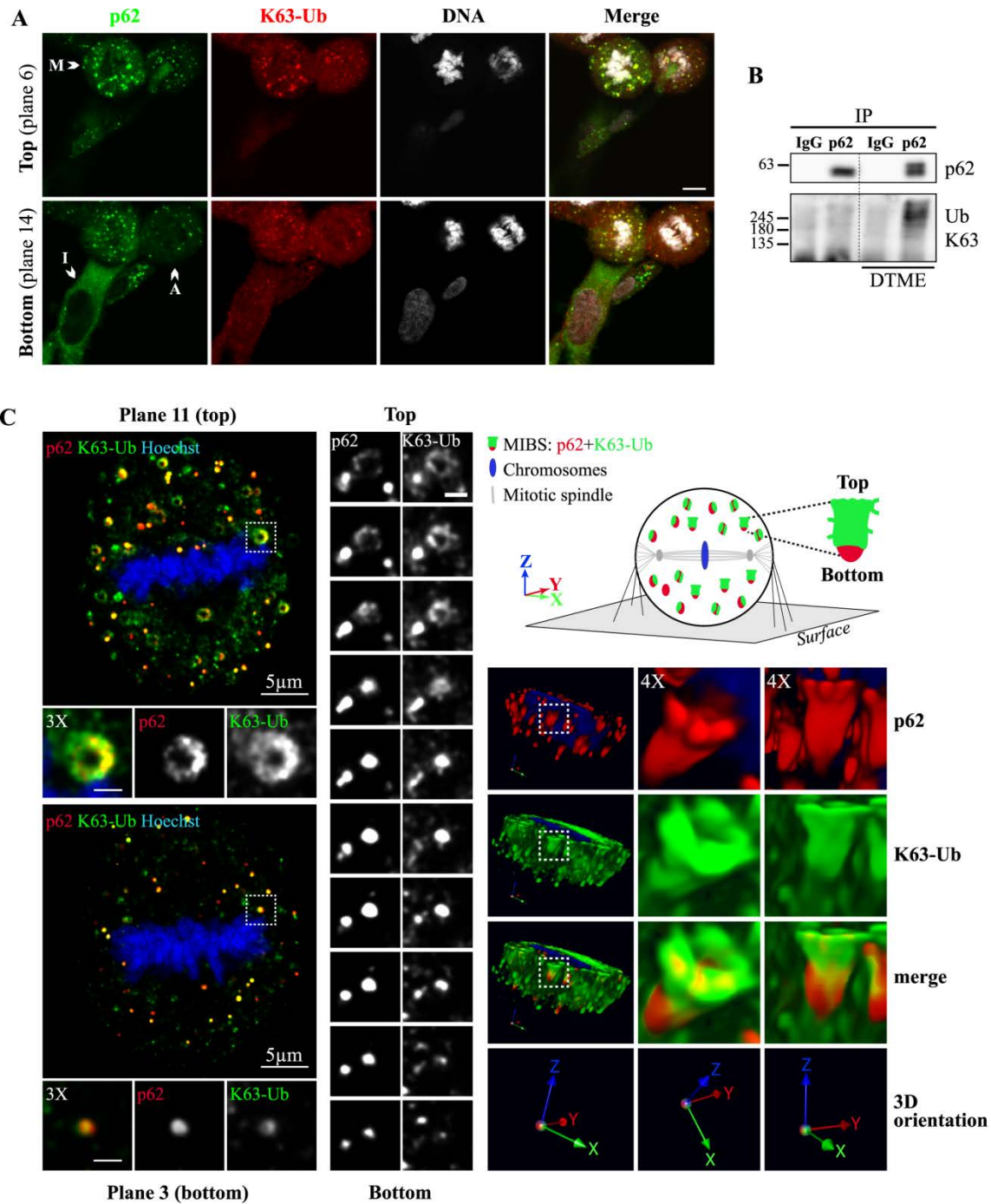


Figure 2.7: MIBS recruit K63 polyubiquitin chains and show a distinctive arrangement. (A) Confocal image planes of HeLa cells synchronized in mitosis by the double thymidine block method, showing staining of p62, K63 polyubiquitin (K63-Ub) and DNA (Hoechst); arrowheads designate cells either at metaphase (M), anaphase (A) or interphase (I); Bar: 10 μ m. (B) P62 IPs were prepared using anti-p62 or rabbit IgG from mitotic HeLa cells synchronized with nocodazole and collected by mitotic shake off; cells have been treated with a reversible crosslinker DTME or the vehicle prior to cell lysis, and p62 IPs were analyzed by Western blot using anti-p62 or anti-K63 polyubiquitin. (C) Gated 3D STED imaging of endogenous p62 and K63 polyubiquitin chains in fixed HeLa cells undergoing an unperturbed mitosis. P62 and K63 polyubiquitin were stained using Alexa Fluor 594- and ATTO 647N-labelled secondary antibodies, respectively, and depletion was performed with a laser at 775. Deconvolution was performed with the Huygens software. **Left panels:**

Single plane STED images from a Z-stack of 23 planes from a cell at metaphase; magnification of the boxed regions emphasize the organization of a single MIBS, insert bars: 1 μm . **Middle panels:** Single plane STED images of isolated MIBS from a Z-stack of 30 planes in a metaphase cell; Bar: 1 μm . **Right panels:** 3D reconstitution of STED image stacks with zoom on a large MIBS. The colored arrows indicate the orientation in the third dimension (XYZ). A hypothetical scheme of the putative arrangement of K63 polyubiquitin and cores of p62 forming MIBS is presented at the top. Please note that all controls for bleed-through, artefact of depletion and scan directions have corroborated the data.

2.6. Discussion

BAG3 emerged as a multi-functional co-chaperone with pivotal impacts on several crucial biological processes including mitotic progression, but little is known on the regulatory mechanisms involved. In this study, we present evidence that BAG3 is a bona fide substrate of CDK1 that collaborates with its chaperone partner HSPB8 to control the molecular assembly of the sequestosome protein p62 into high ordered *mitotic inclusion body structures* (MIBS). Because site-specific phosphorylation of BAG3 regulates both its HSPB8-dependent function in mitotic cell remodeling and MIBS assembly, we suggest that it activates a chaperone-mediated spatial quality control mechanism. Such a pathway could limit mitotic signaling in a spatially and temporally restricted manner for faithful mitotic progression.

Currently, little is known on the mechanisms that regulate the rather promiscuous partnerships of BAG3 and thereby control its diverse activities. Here, we identified phosphorylation at T285 on BAG3 by CDK1 as one important determinant of its specific function in mitotic spindle orientation and mitotic rounding. The non-phosphorylatable as well as phospho-mimetic BAG3 mutants both exhibited loss-of-function in mitotic phenotypes. Still, they were proficient in stabilization of HSPB8 protein levels, which depend on a stable interaction with BAG3 [29, 41, 50]. These results support a requirement for proper dynamics of BAG3 phosphorylation. While substitution of T285 to an Asp residue may not completely mimic the effect of phosphorylation, the maintenance of BAG3 phosphorylation in mitotic cells relied on CDK1 activity and was abrogated within minutes upon inhibition of the mitotic kinase (Fig. 2.2A, Fig. S2.3B). Therefore, we infer that the loss-of-function of BAG3 mutants are not a consequence of unspecific structural defects. Several lines of evidence suggest that the chaperone activity of HSPB8 may promote coupling of BAG3 to its mitotic partners p62 and CDK1 and stabilize dynamics structural changes in BAG3 that might be mediated by phosphorylation. First, BAG3 phosphorylation is facilitated by HSPB8 and BAG3 protein levels are stabilized by HSPB8 mainly during M-phase (Fig. S2B) [50]. Second, the association of BAG3 to p62 and CDK1 is enhanced during mitosis and depends on the same structural motifs, including the HSPB8 binding sites IPV (Fig. 2.4A) [12]. Third, the levels of T285-phosphorylated BAG3 are

modulated by p62 and CDK1 (Fig. 2.4B). Because HSPB8 and BAG3 also appeared to facilitate p62 phosphorylation at the sites modified by CDK1, we suggest that the formation of a tertiary complex composed of BAG3-HSPB8-p62 at mitotic entry is critical for enabling its regulation by CDK1, thus offering a molecular platform for MIBS assembly.

The reason underlying the dynamic behavior of BAG3 phosphorylation during mitosis is currently unclear but could relate to the predicted mode of chaperoning by HSPB proteins and the function of BAG3-HSPB8 in MIBS assembly. HSPB proteins are ATP-independent chaperones that form large oligomers. They are believed to serve as “holdases” to sequester proteins, such as misfolded proteins during stress or actin monomers under steady-state conditions [32]. Target proteins would be released for recycling or repair/degradation upon dynamics structural changes in the oligomers, which are typically triggered by phosphorylation [76]. HSPB8, however, may have a distinct mode of action and a more substrate-dependent chaperone activity[34]. HSPB8 forms dimers that are stabilized by a physical interaction with BAG3, and during mitosis, the proteins are mutually dependent [50]. We show here that MIBS formation needs assistance from the BAG3-HSPB8 chaperone complex and relies on BAG3 phosphorylation. Therefore, the dynamics of BAG3 phosphorylation could regulate a putative holdase activity assisting in the assembly of p62 supramolecular structures. MIBS seem to dynamically change over the course of mitotic progression, and MIBS behaved as labile structures that dissociated during purification without cross-linking. It could be that BAG3 phosphorylation at T285 and/or at other mitotic sites facilitate recruitment of K63 polyubiquitin-tagged proteins and MIBS assembly. Changes in BAG3 phosphorylation, which are likely to modify HSPB8-BAG3 complex structure, could be required to release mature MIBS. Such a model would be consistent with the function of molecular chaperones that involves iterative cycles of binding and release [77]. Our preliminary results suggest that other residues within the PXXP motifs of BAG3, which is shown here to contribute its association with p62 and CDK1, can also be modified by CDK1 (data not shown). Whether and how they may regulate MIBS assembly remain to be investigated and should help clarify the mechanism involved.

Our first characterization of MIBS suggests that they share some properties with membrane-less compartments, which are proposed to assemble through a process of demixing and protein self-assembly termed “phase separation”. Protein phase transition emerged as a novel way for the cell to compartmentalize and regulate biochemical reactions, of increasing interest for the formation of mitotic structures [78-80]. Our super-resolution microscopic analyses revealed a distinctive arrangement of K63 polyubiquitin chains around p62-labelled core structures, which exhibited a

sphere-like shape. These features of MIBS suggest that they may not fit the classical definition of “aggregates”. Intriguingly, HSPB8 and BAG3 are characterized as intrinsically disordered proteins, a feature of proteins prone to phase separate [81]. Notably, we have shown that HSPB8 and BAG3 associate with the centrosome, a membrane-less organelle, at the G2/M border [12]. It has been reported that p62 can undergo phase separation upon addition of K63 polyubiquitin chain to p62 in a test tube, resulting in enrichment of high-molecular weight ubiquitin signals into p62 droplets [82]. Moreover, within cells, the type of ubiquitin chains has major impacts on p62 clustering. Other analyses of p62-ubiquitin clusters organization have suggested that they form through a p62 helical filament core crosslinked by polyubiquitinated substrates within which, the ubiquitin substrates would show high mobility [61, 83]. Thus, MIBS properties seem consistent with current models for the organization of specific sequestering structures by p62. Based on our results and those formerly published, we argue that MIBS formation is not due to unspecific protein aggregation but likely reflects a specific ubiquitin-controlled sorting center that respond to mitotic signals. To our knowledge, this is the first report of a mitotically-regulated change in the supramolecular organization of p62, which clearly warrants further investigation.

While MIBS remain to be deciphered at a functional level, they point to the existence of significant connections between protein quality control (PQC) and mitotic signaling. The canonical formation of p62 body is mediated by p62 phosphorylation at stress-induced sites, which define p62’s sequestering activity and unleash a cytoprotective response, a process which is regulated by HSPB8 and BAG3 under proteasome insufficiency [41, 70, 84]. MIBS are typified by phosphorylation of p62 at distinct CDK1-modified sites of relevance for mitotic regulation and could thus possess a distinct sequestering activity [59]. The emerging prevalence and complexity of cellular inclusions of various types underscore their essential role in sequestering and triaging proteins for different fates [3, 4]. There is precedent for mitotic cellular inclusions in regulation of mitotic cell remodeling. For instance, cyclin A2-containing dynamic foci can functionally interact with the RhoA GTPase and actin to promote efficient RhoA activation [85, 86]. Furthermore, pools of cyclin A2 and RhoA could be degraded by selective autophagy to limit mitotic signaling in time and space. P62 bodies would provide a platform for segregating signaling complexes and promoting the assembly of autophagosomes, suggesting that MIBS could contribute to autophagic sequestration [61, 70, 83]. Whether distinct sites of active autophagy remain during mitosis or if autophagy stalls in mitosis, however, is a controversial issue [87]. Because mitosis provides a very short window of time for remodeling the overall structures of a cell, we suggest that PQC systems might be mobilized by mitotic signals to ensure robust cell shape transitions. This could be achieved in part,

through MIBS formation. Conceptually, MIBS could sequester and prevent aggregation of damaged mitotic components that bear high mechanical stress during cell shape remodeling, or they could provide fine-tuned control, by spatial segregation of signaling complexes acting on cell shape. While we currently favor a model whereby the BAG3-HSPB8-p62 signaling axis and MIBS functionally interact to regulate mitotic cell remodeling, it might also be that MIBS participate to mitotic regulation via an independent mechanism that implicates sensing and sequestration of K63 polyubiquitin chains.

In conclusion, the present work provides significant advances on the mitotic activity of BAG3-HSPB8 chaperone complex, by uncovering its regulation by CDK1 and its impact on a novel type of mitotic p62 body. Deciphering MIBS at the molecular and functional levels should provide fundamental insights into the biology of mitotic progression.

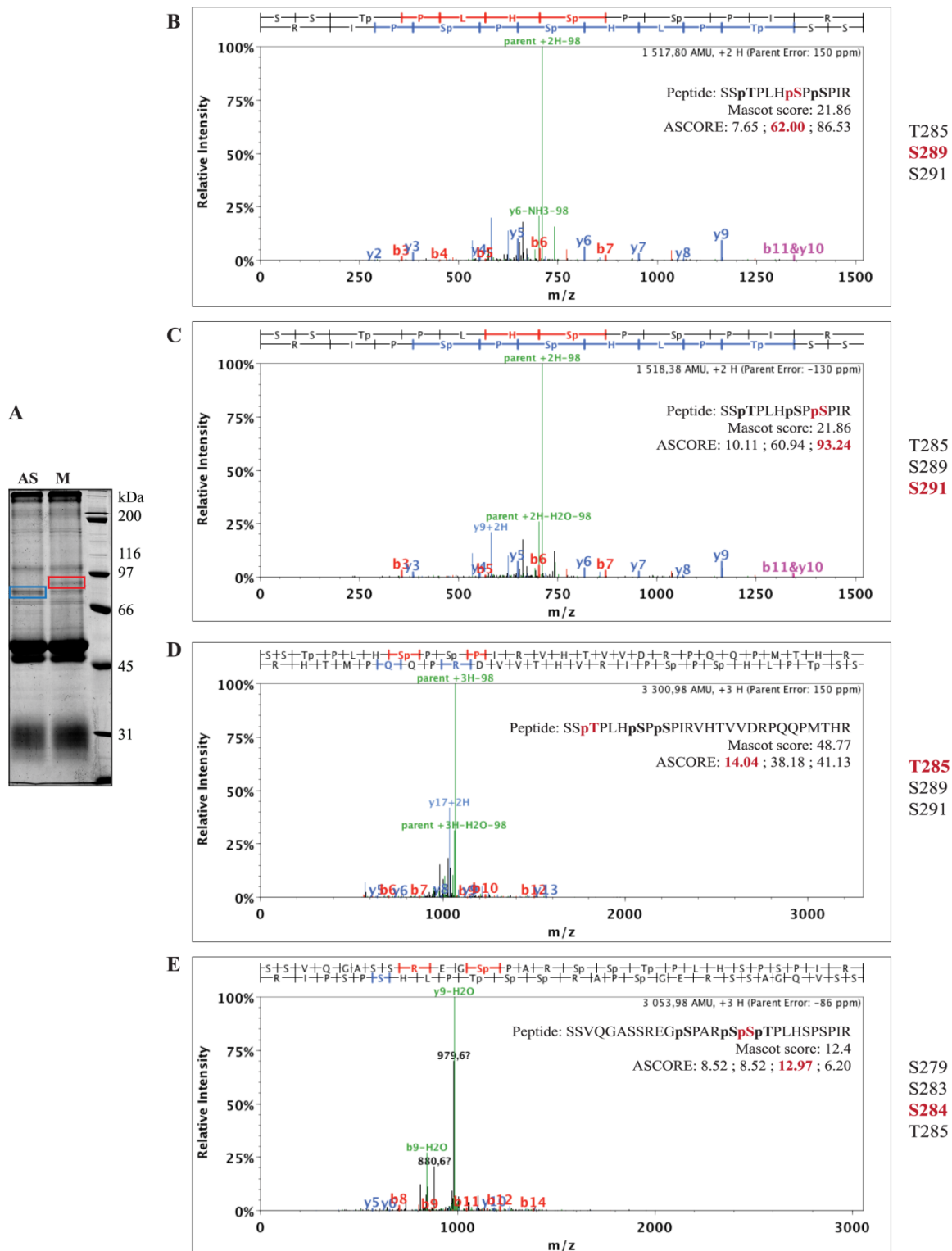


Figure S2.1: Analyses of BAG3 phosphorylated residues by AP-MS. (A) BAG3 IPs were prepared using anti-BAG3 from asynchronous (AS) HEK 293T cells or synchronized in mitosis by nocodazole (400 ng/ml, 16 h) and recovered by mitotic shake off. The different BAG3 bands were revealed by Coomassie staining after SDS-PAGE and were excised, in-gel digested and submitted to MS/MS analysis of the phosphopeptide

content; blue rectangle: interphase BAG3 band; red rectangle: mitotic supershifted BAG3 band. **(B-D)** Representative MS / MS spectra for phosphopeptides containing residues S289 (A), S291 (B), T285 (C) and S284 (D). Mascot scores, for the identification of peptides, and Ascore, for the localization of the phosphorylated site, are indicated in the panels. A total of 2 peptides containing S284 were found, 13 peptides were found for T285, 33 peptides were found for S289 and 14 peptides were found for S291, from 6 independent experiments. m/z, mass per charge; AMU, atomic mass unit.

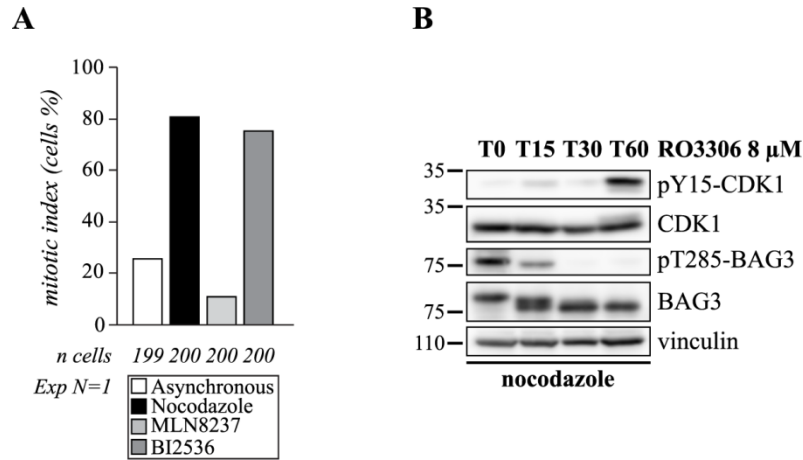


Figure S2.2: (A) Mitotic kinase inhibitors-induced mitotic delays. Graph depicts the percentages of cells at interphase or at the different mitotic stages. HeLa-RFP-H2B cells were incubated for 16 h with 200 ng/ml of nocodazole with or without 1 μM or 5 μM of BI2536 and 0.5 μM or 1 μM of MLN8237, then fixed and processed for immunostaining with an anti-β-tubulin (mitotic spindle) and DNA with Hoechst; data are means from 199 to 200 representative cells. **(B) Maintenance of BAG3 phosphorylation requires CDK1 activity in mitosis.** Western blots of extracts from mitotic HeLa-RFP-H2B (nocodazole-arrested) that have been treated with the CDK1 inhibitor RO3306 for the indicated periods of time, using anti-PY15-CDK1 (inactive CDK1), anti-CDK1, anti-pT285-BAG3 and anti-BAG3. The levels of vinculin are shown as loading control. Mitotic cells were recovered by mitotic shake off; the results represent 2 independent experiments.

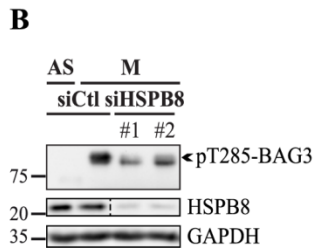
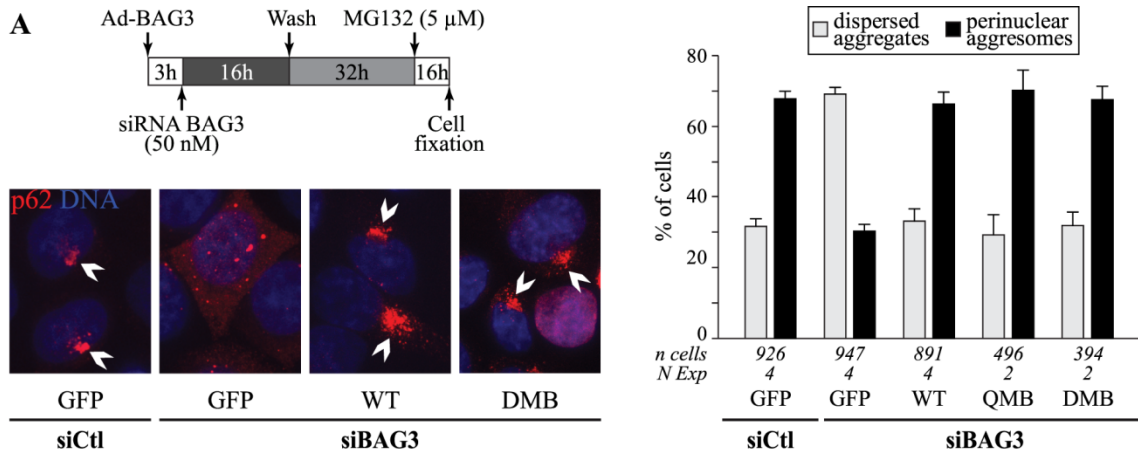
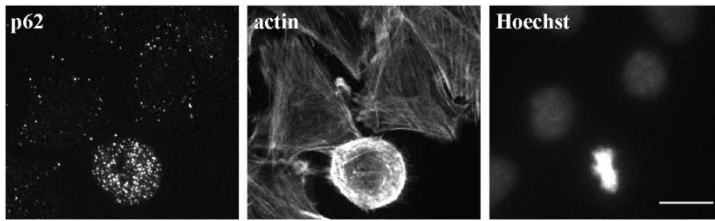


Figure S2.3: (A) The non-phosphorylatable BAG3-GFP mutants can rescue aggresome formation in BAG3-depleted cells. (A) Schematic of the protocol used to perform depletion-rescue experiments for aggresome assembly upon proteasome inhibition in BAG3-depleted HeLa-RFP-H2B cells. Cells were treated with BAG3-specific siARN targeting the 3'UTR region (siBAG3#3), transduced with recombinant adenoviruses driving expression of GFP or BAG3-GFP proteins, as indicated, and then treated with 5 μ M of MG132 for 16 h. Cells were fixed and processed for immunostaining of endogenous p62 with an anti-p62; DNA was stained with Hoescht. Merged plane images from confocal stacks show dispersed microaggregates of p62 (siBAG3+GFP) or a perinuclear aggresome (white arrows: siCtl+GFP, siBAG3+WT, siBAG3+DMB). Graph depicts the percentages of cells with p62 dispersed aggregates versus a perinuclear aggresome; means \pm SE from 394 to 926 cells from 2 to 4 independent experiments. **(B) HSPB8 facilitates mitotic BAG3 phosphorylation at T285.** Western blots of extracts prepared from asynchronous (AS) HeLa cells or synchronized in mitosis by a nocodazole treatment (16h, 100ng/ml) and recovered by mitotic shake off (M); cells were treated with control siRNA (siCtl) or HSPB8-specific siRNAs (siHSPB8). GAPDH: loading control. Results represent 2 independent experiments.

A C2C12 cells



B MCF-7 cells

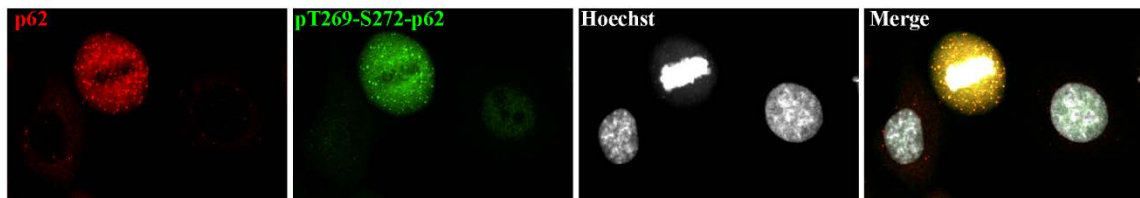


Figure S2.4: MIBS are detected in normal mouse C2C12 muscle cells and in parental CCL2 HeLa cells. (A) Merged plane images from confocal stacks of asynchronous parental CCL2 HeLa cells stained for p62 and mitotically-phosphorylated p62 (pT269-S272), showing MIBS enrichment in phosphorylated p62 in a metaphase cell (arrow), compared to barely detectable p62 bodies in 2 interphase cells; DNA was stained with Hoescht, Bar: 20 μm . (B) Merged plane images from confocal stacks of asynchronous C2C12 cells stained for p62, F-actin (phalloidin) and DNA (Hoescht). Please note that the mitotic round cell exhibits numerous p62 bodies compared to interphase cells; Bar : 20 μm .

2.7. Materials and methods

Expression Vectors, Recombinant Adenoviruses and Baculoviruses

BAG3 phosphomutants constructs were generated by PCR using the BAG3-GFP_WT as template and the following primers:

BAG3_S284-T285A.gen: 5'- CCA GCC AGG AGC GCC GCG CCA CTC CAC TCC -3';

BAG3_S284-T285A.rev: 5'- GGA GTG GAG TGG CGC GGC GCT CCT GGC TGG -3';

BAG3_T285D.gen: 5'- CCA GCC AGG AGC AGCGAC CCA CTC CAC TCC -3';

BAG3_T285D.rev: 5'- GGA GTG GAG TGG GTC GCT GCT CCT GGC TGG-3';

BAG3_S289A.gen: 5'- CGCCACTCCACGCCCCCTCGCCCATC -3';

BAG3_S289A.rev: 5'- GATGGGCGAGGGGGCGTGGAGTGGCG-3';

BAG3_S291A.gen: 5'- CTCCACTCCCCGCGCCCATCCGTGTG-3';

BAG3_S291A.rev: 5'- CACACGGATGGGCGCGGGGGAGTGGAG-3'.

All constructs were confirmed by DNA sequence analyses. Recombinant adenoviruses for expression of BAG3-GFP proteins (WT, Δ PXXP (Δ 302-418) or IPV [I96V/V98G/I208G/V210G] used for immunoprecipitation experiments and production of recombinant adenoviruses for S284A-T285A, S284A-T285A-S289A-S291A and T285D, (Welgen Inc, Worcester, MA) were described [12]. All recombinant adenoviruses were confirmed by sequencing of the inserted sequences. Virus titers were determined using the AdenoX Rapid titer kit (ClontechLaboratories, #631028). The CellLightBacMam 2.0 ready to use reagents Bac-RFP- α -tubulin was from Life Technologies (C10614).pcDNA5/FRT/TO/BAG3-GFP_WT or mutants were generated by subcloning BAG3-GFP DNA (described above) into pcDNA5/FRT/TO by transferring the BamHI/XhoI fragment and were used to generate to obtain inducible HeLa-Flp-In-TREx-BAG3-GFP cells lines. pcDNA5/FRT/TO and pOG44 plasmids were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Antibodies and Chemicals.

The following antibodies were used for Western blot: rabbit anti-BAG3 was described in [12]. To raise the anti-phospho-T285, the antigen for rabbit immunization were prepared with the phospho-peptide CGSPARSS(phosT)PLHS (pT285-BAG3) crosslinked on Keyhole Lympets Hemocyanin (KLH) with dimethylformamide (MBS). Serum was affinity-purified using a phospho-peptide column crosslinked with the Sulfolink Immobilization kit for peptides (Pierce #44999).The non-phospho-peptide antibodies were then absorbed on a non-phospho-peptide column and anti-phospho-peptide IgG were collected in flow throw eluates, concentrated and kept at -20°C in 50% glycerol in PBS. For Western blot: anti-cyclin B1 (sc-245), anti-GFP (sc-9996), anti-p62 (sc-28359) and anti-

CDK1 (sc- 954) were from Santa Cruz Biotechnology; anti-GAPDH Clone 6C5 (Fitzgerald, #10R-G109a) and anti-Ub-K63 (#05-1308) were from Millipore; anti-vinculin (V9131) was from Sigma-Aldrich; anti-pT269-S272-p62/SQSTM1 (#13121) and anti-pY15-CDK1 (#9111S) were from Cell Signaling Technologies. For IP: anti-GFP (A-11120) was from Molecular Probes/Thermo Fisher. For immunofluorescence: anti-p62 (sc-28359) was from Santa Cruz Biotechnology; anti- α -tubulin (Abcam, ab18251); anti- α -tubulin (T5168) and anti-Ub-K63 (#05-1308) were from Millipore; anti-pT269-S272-p62/SQSTM1 (#13121) was from Cell Signaling Technologies; Hoechst Bisbenzimidazole H 33342 (B2261); Alexa-Fluor 488 Phalloidin (A12379) were from Molecular Probes/Thermo Fisher; Fibronectine (10 μ g/ml; F1141), Poly-L-Lysine (1 mg/ml; P1399) and Purvalanol A (P4484) were from Sigma-Aldrich. RO-3306 (SML0569), thymidine (T9250), MG132 (Z-leu-leu-leu-al, C2211), doxycycline (D9891), were from Millipore Sigma (Billerica, MA, USA). Nocodazole (487928) and blasticidin (203350) were from Calbiochem. MLN8237 (1028486-01-2) was from Cedarlane and AR-A014418 (S7435) was from Selleckchem. Hygromycin B (HD0230) was from Biobasic Canada, BI2536 (2CT/09) was from JS Research Chemicals Trading and PD098059 (P215) was from Research Biochemicals International.

Cell lines, Cell Culture and Cell Synchronization

HeLa cells (ATCC) [88] and HeLa-RFP-H2B cells (gift from Sabine Elowe) [71] were maintained in α -minimum essential medium (α -MEM) with 10% fetal bovine serum (FBS). HeLa Flp-In-T-Rex cells (gift of Arshad Desai) containing Flp-IN recombination sites and an inducible tetracycline/doxycycline promoter were maintained in α -MEM with 10% FBS, 100 μ g/ml phleomycin D1 (Zeocin) and 10 mg/ml blasticidin S [89]. C2C12 cells (mouse myoblasts; gift from Guillaume Grenier, Faculty of Medicine, Department of Orthopedic Surgery, Sherbrooke, Quebec) were maintained in DMEM High Glucose supplemented with 10 % FBS. This cell line has been widely used as a model for skeletal muscle development (differentiation medium: DMEM High Glucose supplemented with 2% horse serum) [49]. All cell lines were grown in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. HeLa-Flp-In-T-Rex-BAG3-GFP cells lines were generated by transfecting HeLa-Flp-In-T-Rex cells with pcDNA5/FRT/TO-BAG3-GFP-WT, pcDNA5/FRT/TO-BAG3-GFP-S284A-T285A, or pcDNA5/FRT/TO-BAG3-GFP-T285D together with pOG44. Selection of isogenic cell lines was made according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific). HeLa cell lines were synchronized in mitosis by the double thymidine block method [12]. Thymidine/nocodazole block was performed by a 24 h-incubation period with 2 mM of thymidine followed by a 3 h-release period in fresh medium; cells were then synchronized in early mitosis by a 16 h-treatment with nocodazole (40 to 400ng/ml). Mitotic cell extracts were prepared

from cells recovered mechanically by mitotic shake off. Cells were synchronized in G2/M by an 18 h- RO-3306 (8 μ M) block.

Recombinant BAG3 and in vitro Kinase Assay

cDNA coding for human BAG3 were cloned in phase with GST in vector pGEX-4T3. Proteins were expressed in BL21codon+(RIL) (Stratagene), lysed by sonication in PBS supplemented with 0.1% Triton X-100, Complete (Roche) and 1 mM DTT, purified using Glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia), dialysed and concentrated in PBS. Histone H1 (H1917 from Sigma-Aldrich), GST-BAG3 or GST alone were incubated with 3.5units of CDK1/cyclinB1 (P6020S, New England Biolabs) in 20 μ l of 50 mM TRIS-HCl pH 7.4, 200 μ M [γ -³²P]-ATP (3 μ Ci/tube, from Perkin Elmer), 10 mM MgCl₂, and 2 mM DTT during 30 minutes at 30 °C. Proteins were separated on SDS-PAGE, stained with Coomassie BlueR250, and radioactivity was revealed using the imaging system FLA-5100, Fujifilm Life Science. For cold *in vitro* kinase assay, 1 μ g of GST-BAG3 or GST alone were incubated with 3 or 9units of CDK1/cyclinB1 (P6020S, New England Biolabs) in 20 μ l of 15 mM TRIS-HCl pH 7.4, 250 μ M ATP, 12.5mM MgCl₂, and 0.6mM DTT during 45 minutes at 30 °C.

Knockdown-Rescue Experiments, siRNAs and Biochemistry.

For knockdown experiments, HeLa and HeLa-RFP-H2B cells were transfected with 50 nM or 75 nM short interfering RNA (siRNA) duplexes for 16 h by the calcium phosphate transfection method [49]. HeLa-Flp-In-Rex cells were transfected with 50 nM siRNA duplexes, using Lipofectamine RNAiMax Reagent (Thermo Fisher Scientific). The siRNA duplexes were based on human sequences and were purchased from Qiagen (HPP grade siRNA) or Thermo Fisher Scientific (standard A4grade). Sequences of the sense strands are as follows:

siBAG3#1: 5'-CGAAGAGTATTTGACCAA-3'; siBAG3#2:5'-GCAAAGAGGTGGATTCTAA-3'; siBAG3#3 : 5'-GATGTGTGCTTTAGGGAAT-3'; siBAG3#4 5'-

TAACTTGGGTGGAGGCAA-3'; siBAG3#5: 5' – CTGACTTTAGAGAGAGTAATT – 3';

siHSPB8#1: 5'-CAGAGGAGTTGATGGTGAA-3';

siHSPB8#25'-GCAGTGAATGCAAGGGTTATT-3'; sip62#1: 5'-

GGAAATGGGTCCACCAGGA-3'; sip62#2: 5'-AGACCAAGAACTATGACAT-3'.

Control siRNA (siCtl): AllStars Negative Control was purchased from Qiagen, target sequence: 5'-CAGGGTATCGACGATTACAAA-3'. For depletion-rescue experiments, we used a protocole based on the Adenofection method, as described [49]. Briefly, HeLa-RFP-H2B were transduced with Ad-BAG3-GFP at a multiplicity of infection (MOI) of 1 plaque-forming units per cell

(pfu/cell) together with BacMam 2.0 reagents (RFP- α -tubulin) at 4 pfu/cell, and transfected during 48 h with siRNA directed to the 3'-UTR (siBAG3#3 or siBAG3#5); cells were synchronized by the double thymidine (2 mM) block method. For preparing BAG3-GFP IPs, asynchronous HeLa cells or cells arrested in mitosis by a 16h-treatment with nocodazole (200 to 400 ng/ml), were washed in ice-cold PBS and were lysed by 3-cycles of freezing/thawing in 4-volume of lysis buffer (20 mM TRIS-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% IGEPAL, 1 mM NaVO₄, 10 mM NaF, 40 mM β -glycerophosphate, 1X Complete [Roche], 1 mM DTT). Cell extracts were centrifuged at 15,000 g for 15 min, and equal amounts of supernatants were incubated with specific antibodies, previously coupled to Dynabeads protein A (Life Technologies) pre-equilibrated in lysis buffer for 30 min at 4°C. After incubation for 60 min, immuno-complexes were collected using a magnetic stand and washed 3-times in lysis buffer. Equal amounts of immune complexes were loaded on SDS-PAGE and analyzed by Western blot as described before [90]. Protein concentrations were determined with DC protein assay reagent (Bio-Rad) and densitometric analyses were performed with FluorS MAX MultiImager-captured images using the QuantityOne software version 4.5.0 (Bio-Rad Laboratories). HeLa Flp-in T-Rex cell lines were treated with 1 ng/ml of doxycycline for 16 h to induce the expression of BAG3-GFP proteins.

Immunofluorescence, Microscopy and Live Cell Imaging

For immunostaining of mitotic spindle and insoluble mitotic structures, cells were fixed in 4% formaldehyde in 0.2% Triton X-100, 20 mM Pipes, pH 6.8, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 8.0, 4% formaldehyde for 10 min at RT; alternatively, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at RT or in cold methanol (staining of whole p62 structures). Specimens were then processed for immunofluorescence [91, 92], using the indicated primary antibodies and Alexa Fluor goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibodies (Molecular Probes). For gated-STED microscopy, secondary antibodies were conjugated to ATTO 647N and Alexa Fluor-594 (#611-156-122S, Cedarlane). DNA was stained with cell-permeable Hoechst and F-actin was stained with Alexa Fluor phalloidin (Molecular Probes/ Thermo Fisher Scientific, Ottawa, On. CA). Phenotypes were monitored routinely by at least two independent investigators by visual inspection of fixed specimens and were scored in a blind manner. Phenotypes investigations and epifluorescence images were performed with an AxioObserver Z1 system using a 40x Plan-Neofluoar 0.6NA objective, and a charged-coupled device (CCD) camera AxioCamMRm controlled by the Zen software (Carl Zeiss). Mitotic rounding was quantified by visual inspection of defects in mitosis as followed: partially rounded or flat mitotic cells. Defects in aggresome formation were scored by the presence of microaggregates versus a perinuclear aggresome defined as a cluster of ubiquitinated

proteins localized close to nucleus. Confocal microscopy of fixed cells for MIBS quantification, and live cell experiments were performed with a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal (60x oil 1.4 NA or 40x 0.75 NA objectives respectively) equipped with an EMCCD cooled charge-coupled camera at -50°C (Hamamatsu Photonics K.K) and driven by Volocity software version 6.01, equipped with a humidified 5% CO₂ thermoregulated chamber. For live-cell imaging, HeLa-RFP-H2B cells were seeded on fibronectin-coated glass dishes (MatTek Corporation, USA) and images were acquired at 90 seconds intervals for a 75 minutes-period starting at 48 h posttransfection. Mitotic phenotypes were estimated by visual inspection of time-sequences. The numbers of mitotic defects were scored as followed: spindle rotation or mis-positioning and/or delay in mitosis and were estimated from individual cells for three dependent experiments. MIBS were quantified from confocal image stacks in individual cells using the Volocity software based on the intensity and size of objects using a minimum threshold of 0.5 μm ; alternatively, the numbers and size of MIBS were scored from confocal image stacks, by using the 3D imager of the NIS Elements 5.00 software (Nikon). The structures were selected through a minimum-intensity threshold and a minimum size of 0.5 μm . Confocal microscopy of fixed cells for MIBS containing pS403-p62 or pT269-S272-p62 was performed with an AxioObserver Z1 system Zeiss LSM 700 (Plan-Apochromat 63x 1.40 NA oil objective) and driven by Zen 2009 (Carl Zeiss). For gated-STED microscopy, confocal images were acquired with a Leica TCS SP8 STED $\times 3$ microscope equipped with white-light laser, 405-nm diode laser, and HyD detectors, by sequential scanning using the following settings: objective, HC/PL/APO $\times 63/1.40$ oil or $\times 10/0.4$ dry; immersion oil, Leica Type F (refractive index, 1.518); scan speed, 600 Hz; line average, 2–4; and time gate, 0.3–6.0 ns. Laser power and gain were set to optimize signal-to-noise ratio and avoid saturation using the QLUT Glowmode. Sizes of pixel, pinhole, and z-step were set to optimize resolution, or to oversample in the case of images to be deconvolved. STED was performed with a 775-nm depletion laser and the following adapted settings: objective, PL/APO $\times 100/1.40$ oil STED White; line average, 6–8; time gate, 0.5–6.0 ns; STED3D, approximately 50%–75%; and depletion laser intensity, 20% (Alexa Fluor 594) or 10% (Atto 647N). Single-color STED, and dual-color STED after flipping channels for antigen staining was performed to validate the results. Deconvolution was performed with Huygens Professional (Scientific Volume Imaging) using a theoretical point spread function, manual settings for background intensity, and default signal-to-noise ratio. Three-dimensional reconstruction was performed with LAS X 3D Visualisation (Leica). Color balance, contrast, and brightness were adjusted with Photoshop (Adobe).

Statistical Analyses

Statistical calculations were performed using Prism 6.0 software (GraphPad Software). For experiments examining the proportions of cells with mitotic defects or rounding defects in depletion-rescue experiments, the numbers of cells with defects was analyzed relative to the total numbers for each condition using the Fisher's exact test, which is used for small sample sizes with nominal/categorical variables. For experiments examining MIBS assembly, the numbers of MIBS per cell were quantified in individual cells for each condition, and compared using the Kruskal Wallis test (combined with Dunn's multiple comparisons), which is a nonparametric test that compares more than two unpaired groups of ordinal or numerical variables.

Author contributions

C. Luthold, H. Lambert and J.N. Lavoie designed research; C. Luthold, H. Lambert, M. Fuchs, S.M. Guilbert, M-A Rodrigue, A.A. Varlet and A. Dumas performed experiments; C. Luthold, H. Lambert, M. Fuchs and M-A Rodrigue prepared Figures; C. Luthold, H. Lambert, M. Fuchs, M-A Rodrigue and J.N. Lavoie analyzed the data; A. Fradet-Turcotte and L. Vallières provided crucial resources to perform the work; C. Luthold and J.N. Lavoie wrote the paper.

Acknowledgments— We thank S. Elowe and Lavoie's lab members for insightful discussions. We are grateful to Dr Arshad Desai (Flp-In-T-REx HeLa cells; Ludwig Institute for Cancer Research, University of California, San Diego, CA), Dr Sabine Elowe (CHU de Québec-Université Laval Research Center, Reproduction, mother and young health division, Qc, Canada), and Dr Serge Rivest (CHU de Québec-Université Laval Research Center, Neurosciences division, Qc. Canada) for providing critical reagents and microscopic resources. We thank Carl St-Pierre (CHU de Québec-Université Laval Research Center, Oncology division, Qc. Canada) for assistance in microscopic analyses, and Dr Nicolas Bisson (CHU de Québec-Université Laval Research Center, Oncology division, Qc. Canada) for his assistance in the analysis of MS data significance. Mass spectrometry was performed at the CHU de Québec-Université Laval Research Center Proteomics Platform. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (Grant No 7088 to JNL). M-A Rodrigue is supported by a studentship from the Université Laval Cancer Research Center.

2.8. References

1. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(10):630-42. Epub 2013/09/13. doi: 10.1038/nrm3658. PubMed PMID: 24026055; PubMed Central PMCID: PMC4340576.
2. Quinlan RA, Ellis RJ. Chaperones: needed for both the good times and the bad times. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 2013;368(1617):20130091. Epub 2013/03/27. doi: 10.1098/rstb.2013.0091. PubMed PMID: 23530265; PubMed Central PMCID: PMC3638401.
3. Wolff S, Weissman JS, Dillin A. Differential scales of protein quality control. *Cell.* 2014;157(1):52-64. doi: 10.1016/j.cell.2014.03.007. PubMed PMID: 24679526.
4. Scior A, Juenemann K, Kirstein J. Cellular strategies to cope with protein aggregation. *Essays Biochem.* 2016;60(2):153-61. doi: 10.1042/EBC20160002. PubMed PMID: 27744331.
5. Bassermann F, Eichner R, Pagano M. The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(1):150-62. Epub 2013/03/08. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.02.028. PubMed PMID: 23466868; PubMed Central PMCID: PMC3694769.
6. Teixeira LK, Reed SI. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annual review of biochemistry.* 2013;82:387-414. Epub 2013/03/19. doi: 10.1146/annurev-biochem-060410-105307. PubMed PMID: 23495935.
7. Kakihana A, Oto Y, Saito Y, Nakayama Y. Heat shock-induced mitotic arrest requires heat shock protein 105 for the activation of spindle assembly checkpoint. *FASEB J.* 2018:fj201801369R. Epub 2018/11/30. doi: 10.1096/fj.201801369R. PubMed PMID: 30496702.
8. Fang CT, Kuo HH, Pan TS, Yu FC, Yih LH. HSP70 regulates the function of mitotic centrosomes. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(20):3949-60. Epub 2016/05/04. doi: 10.1007/s00018-016-2236-8. PubMed PMID: 27137183.
9. Elsing AN, Aspelin C, Bjork JK, Bergman HA, Himanen SV, Kallio MJ, et al. Expression of HSF2 decreases in mitosis to enable stress-inducible transcription and cell survival. *J Cell Biol.* 2014;206(6):735-49. Epub 2014/09/10. doi: 10.1083/jcb.201402002. PubMed PMID: 25202032; PubMed Central PMCID: PMC4164949.
10. Kenworthy AK. Have we become overly reliant on lipid rafts? Talking Point on the involvement of lipid rafts in T-cell activation. *EMBO Rep.* 2008;9(6):531-5. PubMed PMID: 18516088.
11. Yang Y, Wang W, Li M, Gao Y, Zhang W, Huang Y, et al. NudCL2 is an Hsp90 cochaperone to regulate sister chromatid cohesion by stabilizing cohesin subunits. *Cell Mol Life Sci.* 2018. Epub 2018/10/29. doi: 10.1007/s00018-018-2957-y. PubMed PMID: 30368549.
12. Fuchs M, Luthold C, Guilbert SM, Varlet AA, Lambert H, Jetté A, et al. A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis. *PLoS Genetics.* e1005582 doi: 101371. 2015;11(10).
13. Niikura Y, Kitagawa R, Ogi H, Kitagawa K. SGT1-HSP90 complex is required for CENP-A deposition at centromeres. *Cell Cycle.* 2017;16(18):1683-94. Epub 2017/08/18. doi: 10.1080/15384101.2017.1325039. PubMed PMID: 28816574; PubMed Central PMCID: PMC5602426.
14. Bandura JL, Jiang H, Nickerson DW, Edgar BA. The molecular chaperone Hsp90 is required for cell cycle exit in *Drosophila melanogaster*. *PLoS genetics.* 2013;9(9):e1003835. Epub 2013/10/03. doi: 10.1371/journal.pgen.1003835. PubMed PMID: 24086162; PubMed Central PMCID: PMC3784567.
15. Liu XS, Song B, Tang J, Liu W, Kuang S, Liu X. Plk1 phosphorylates Sgt1 at the kinetochores to promote timely kinetochore-microtubule attachment. *Mol Cell Biol.* 2012;32(19):4053-67. Epub 2012/08/08. doi: 10.1128/MCB.00516-12. PubMed PMID: 22869522; PubMed Central PMCID: PMC3457539.
16. Yang Y, Yan X, Cai Y, Lu Y, Si J, Zhou T. NudC-like protein 2 regulates the LIS1/dynein pathway by stabilizing LIS1 with Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3499-504. Epub 2010/02/06. doi: 10.1073/pnas.0914307107. PubMed PMID: 20133715; PubMed Central PMCID: PMC2840461.
17. Martins T, Maia AF, Steffensen S, Sunkel CE. Sgt1, a co-chaperone of Hsp90 stabilizes Polo and is required for centrosome organization. *EMBO J.* 2009;28(3):234-47. Epub 2009/01/10. doi: 10.1038/emboj.2008.283. PubMed PMID: 19131964; PubMed Central PMCID: PMC2637337.
18. Basto R, Gergely F, Draviam VM, Ohkura H, Liley K, Raff JW. Hsp90 is required to localise cyclin B and Mps/ch-TOG to the mitotic spindle in *Drosophila* and humans. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 7):1278-87. Epub 2007/03/23. doi: 10.1242/jcs.000604. PubMed PMID: 17376965.

19. Fortugno P, Beltrami E, Plescia J, Fontana J, Pradhan D, Marchisio PC, et al. Regulation of survivin function by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):13791-6. Epub 2003/11/14. doi: 10.1073/pnas.2434345100. PubMed PMID: 14614132; PubMed Central PMCID: PMCPMC283500.
20. Lange BM, Rebollo E, Herold A, Gonzalez C. Cdc37 is essential for chromosome segregation and cytokinesis in higher eukaryotes. *EMBO J*. 2002;21(20):5364-74. Epub 2002/10/11. PubMed PMID: 12374737; PubMed Central PMCID: PMCPMC129064.
21. Goes FS, Martin J. Hsp90 chaperone complexes are required for the activity and stability of yeast protein kinases Mik1, Wee1 and Swe1. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001;268(8):2281-9. Epub 2001/04/12. PubMed PMID: 11298745.
22. Aligue R, Akhavan-Niak H, Russell P. A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90. *EMBO J*. 1994;13(24):6099-106. Epub 1994/12/15. PubMed PMID: 7813446; PubMed Central PMCID: PMCPMC395589.
23. Tang Z, Dai S, He Y, Doty RA, Shultz LD, Sampson SB, et al. MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1. *Cell*. 2015;160(4):729-44. Epub 2015/02/14. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.028. PubMed PMID: 25679764.
24. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell*. 2009;136(5):823-37. PubMed PMID: 19269363.
25. Taipale M, Tucker G, Peng J, Krykbaeva I, Lin ZY, Larsen B, et al. A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways. *Cell*. 2014;158(2):434-48. Epub 2014/07/19. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.039. PubMed PMID: 25036637; PubMed Central PMCID: PMC4104544.
26. Behl C. Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease. *Trends in pharmacological sciences*. 2016;37(8):672-88. Epub 2016/05/11. doi: 10.1016/j.tips.2016.04.007. PubMed PMID: 27162137.
27. Kabbage M, Dickman MB. The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(9):1390-402. Epub 2008/02/12. doi: 10.1007/s00018-008-7535-2. PubMed PMID: 18264803.
28. Klimek C, Kathage B, Wordehoff J, Hohfeld J. BAG3-mediated proteostasis at a glance. *J Cell Sci*. 2017;130(17):2781-8. Epub 2017/08/16. doi: 10.1242/jcs.203679. PubMed PMID: 28808089.
29. Carra S, Seguin SJ, Lambert H, Landry J. HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem*. 2008;283(3):1437-44. Epub 2007/11/17. doi: 10.1074/jbc.M706304200. PubMed PMID: 18006506.
30. Morelli FF, Mediani L, Heldens L, Bertacchini J, Bigi I, Carra AD, et al. An interaction study in mammalian cells demonstrates weak binding of HSPB2 to BAG3, which is regulated by HSPB3 and abrogated by HSPB8. *Cell stress & chaperones*. 2017;22(4):531-40. Epub 2017/02/10. doi: 10.1007/s12192-017-0769-x. PubMed PMID: 28181153; PubMed Central PMCID: PMCPMC5465030.
31. Ungelenk S, Moayed F, Ho CT, Grousl T, Scharf A, Mashaghi A, et al. Small heat shock proteins sequester misfolding proteins in near-native conformation for cellular protection and efficient refolding. *Nature communications*. 2016;7:13673. doi: 10.1038/ncomms13673. PubMed PMID: 27901028; PubMed Central PMCID: PMCPMC5141385.
32. Guilbert SM, Varlet A-A, Fuchs M, Lambert H, Landry Ja, Lavoie JN. Regulation of Actin-Based Structure Dynamics by HspB Proteins and Partners. . In: Hightower ERTaL, editor. *The Big Book of Small Heat Shock Proteins*. ISBN: 978-3-319-16076-4.: Springer international Publishing AG 2015.
33. Mymrikov EV, Seit-Nebi AS, Gusev NB. Heterooligomeric complexes of human small heat shock proteins. *Cell stress & chaperones*. 2012;17(2):157-69. doi: 10.1007/s12192-011-0296-0. PubMed PMID: 22002549; PubMed Central PMCID: PMCPMC3273557.
34. Mymrikov EV, Daake M, Richter B, Haslbeck M, Buchner J. The Chaperone Activity and Substrate Spectrum of Human Small Heat Shock Proteins. *J Biol Chem*. 2017;292(2):672-84. doi: 10.1074/jbc.M116.760413. PubMed PMID: 27909051; PubMed Central PMCID: PMCPMC5241741.
35. Chen Y, Yang LN, Cheng L, Tu S, Guo SJ, Le HY, et al. Bcl2-associated athanogene 3 interactome analysis reveals a new role in modulating proteasome activity. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2013;12(10):2804-19. Epub 2013/07/05. doi: 10.1074/mcp.M112.025882. PubMed PMID: 23824909; PubMed Central PMCID: PMC3790292.
36. Rosati A, Graziano V, De Laurenzi V, Pascale M, Turco MC. BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell death & disease*. 2011;2:e141. Epub 2011/04/08. doi: 10.1038/cddis.2011.24. PubMed PMID: 21472004; PubMed Central PMCID: PMC3122056.

37. Gamberdinger M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *Embo J.* 2009;28(7):889-901. PubMed PMID: 19229298.
38. Gamberdinger M, Kaya AM, Wolfrum U, Clement AM, Behl C. BAG3 mediates chaperone-based aggresome-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep.* 2011;12(2):149-56. Epub 2011/01/22. doi: 10.1038/embor.2010.203. PubMed PMID: 21252941; PubMed Central PMCID: PMC3049430.
39. Minoia M, Boncoraglio A, Vinet J, Morelli FF, Brunsting JF, Poletti A, et al. BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. *Autophagy.* 2014;10(9):1603-21. Epub 2014/07/22. doi: 10.4161/auto.29409. PubMed PMID: 25046115.
40. Sturner E, Behl C. The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:177. Epub 2017/07/07. doi: 10.3389/fnmol.2017.00177. PubMed PMID: 28680391; PubMed Central PMCID: PMC5478690.
41. Guilbert SM, Lambert H, Rodrigue MA, Fuchs M, Landry J, Lavoie JN. HSPB8 and BAG3 cooperate to promote spatial sequestration of ubiquitinated proteins and coordinate the cellular adaptive response to proteasome insufficiency. *FASEB J.* 2018:fj201700558RR. Epub 2018/02/07. doi: 10.1096/fj.201700558RR. PubMed PMID: 29405094.
42. Xu Z, Graham K, Foote M, Liang F, Rizkallah R, Hurt M, et al. 14-3-3 protein targets misfolded chaperone-associated proteins to aggresomes. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 18):4173-86. Epub 2013/07/12. doi: 10.1242/jcs.126102. PubMed PMID: 23843611; PubMed Central PMCID: PMC3772389.
43. Taniguchi K, Yamachika S, He F, Karin M. p62/SQSTM1-Dr. Jekyll and Mr. Hyde that prevents oxidative stress but promotes liver cancer. *FEBS Lett.* 2016;590(15):2375-97. doi: 10.1002/1873-3468.12301. PubMed PMID: 27404485; PubMed Central PMCID: PMC4983218.
44. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(6):230-6. Epub 2012/03/20. doi: 10.1016/j.tibs.2012.02.008. PubMed PMID: 22424619; PubMed Central PMCID: PMC3531712.
45. Colvin TA, Gabai VL, Gong J, Calderwood SK, Li H, Gummuluru S, et al. Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer Res.* 2014. Epub 2014/07/06. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0747. PubMed PMID: 24994713.
46. Ulbricht A, Eppler FJ, Tapia VE, van der Ven PF, Hampe N, Hersch N, et al. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Curr Biol.* 2013;23(5):430-5. doi: 10.1016/j.cub.2013.01.064. PubMed PMID: 23434281.
47. Arndt V, Dick N, Tawo R, Dreiseidler M, Wenzel D, Hesse M, et al. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol.* 2010;20(2):143-8. Epub 2010/01/12. doi: 10.1016/j.cub.2009.11.022. PubMed PMID: 20060297.
48. Kathage B, Gehlert S, Ulbricht A, Ludecke L, Tapia VE, Orfanos Z, et al. The cochaperone BAG3 coordinates protein synthesis and autophagy under mechanical strain through spatial regulation of mTORC1. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1864(1):62-75. Epub 2016/10/21. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.10.007. PubMed PMID: 27756573.
49. Fuchs M, Boulanger MC, Lambert H, Landry J, Lavoie JN. Adenofection: A Method for Studying the Role of Molecular Chaperones in Cellular Morphodynamics by Depletion-Rescue Experiments. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2016;(115). doi: 10.3791/54557. PubMed PMID: 27685647.
50. Varlet AA, Fuchs M, Luthold C, Lambert H, Landry J, Lavoie JN. Fine-tuning of actin dynamics by the HSPB8-BAG3 chaperone complex facilitates cytokinesis and contributes to its impact on cell division. *Cell stress & chaperones.* 2017;22(4):553-67. doi: 10.1007/s12192-017-0780-2. PubMed PMID: 28275944.
51. Hornbeck PV, Zhang B, Murray B, Kornhauser JM, Latham V, Skrzypek E. PhosphoSitePlus, 2014: mutations, PTMs and recalibrations. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D512-20. Epub 2014/12/18. doi: 10.1093/nar/gku1267. PubMed PMID: 25514926; PubMed Central PMCID: PMC4383998.
52. Beausoleil SA, Villen J, Gerber SA, Rush J, Gygi SP. A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. *Nature biotechnology.* 2006;24(10):1285-92. Epub 2006/09/12. doi: 10.1038/nbt1240. PubMed PMID: 16964243.
53. Simpson-Lavy KJ, Oren YS, Feine O, Sajman J, Listovsky T, Brandeis M. Fifteen years of APC/cyclosome: a short and impressive biography. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(Pt 1):78-82. Epub 2010/01/16. doi: 10.1042/BST0380078. PubMed PMID: 20074039.

54. Petrone A, Adamo ME, Cheng C, Kettenbach AN. Identification of Candidate Cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1) Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics. *Molecular & cellular proteomics* : MCP. 2016;15(7):2448-61. Epub 2016/05/03. doi: 10.1074/mcp.M116.059394. PubMed PMID: 27134283; PubMed Central PMCID: PMC4937516.
55. Vassilev LT, Tovar C, Chen S, Knezevic D, Zhao X, Sun H, et al. Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(28):10660-5. Epub 2006/07/05. doi: 10.1073/pnas.0600447103. PubMed PMID: 16818887; PubMed Central PMCID: PMC1502288.
56. Manfredi MG, Ecsedy JA, Chakravarty A, Silverman L, Zhang M, Hoar KM, et al. Characterization of Alisertib (MLN8237), an investigational small-molecule inhibitor of aurora A kinase using novel in vivo pharmacodynamic assays. *Clin Cancer Res*. 2011;17(24):7614-24. Epub 2011/10/22. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1536. PubMed PMID: 22016509.
57. Steegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lenart P, Petronczki M, Krssak M, et al. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol*. 2007;17(4):316-22. Epub 2007/02/13. doi: 10.1016/j.cub.2006.12.037. PubMed PMID: 17291758.
58. Atherton-Fessler S, Liu F, Gabrielli B, Lee MS, Peng CY, Pivnicka-Worms H. Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases. *Mol Biol Cell*. 1994;5(9):989-1001. Epub 1994/09/01. PubMed PMID: 7841526; PubMed Central PMCID: PMC301122.
59. Linares JF, Amanchy R, Greis K, Diaz-Meco MT, Moscat J. Phosphorylation of p62 by cdk1 controls the timely transit of cells through mitosis and tumor cell proliferation. *Mol Cell Biol*. 2011;31(1):105-17. Epub 2010/10/27. doi: 10.1128/MCB.00620-10. PubMed PMID: 20974803; PubMed Central PMCID: PMC3019844.
60. Fuchs M, Poirier DJ, Seguin SJ, Lambert H, Carra S, Charette SJ, et al. Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J*. 2010;425(1):245-55. Epub 2009/10/23. doi: 10.1042/BJ20090907. PubMed PMID: 19845507.
61. Ciuffa R, Lamark T, Tarafder AK, Guesdon A, Rybina S, Hagen WJ, et al. The selective autophagy receptor p62 forms a flexible filamentous helical scaffold. *Cell reports*. 2015;11(5):748-58. Epub 2015/04/30. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.062. PubMed PMID: 25921531.
62. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005;171(4):603-14. Epub 2005/11/16. doi: 10.1083/jcb.200507002. PubMed PMID: 16286508; PubMed Central PMCID: PMC2171557.
63. Itakura E, Mizushima N. p62 Targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding. *J Cell Biol*. 2011;192(1):17-27. doi: 10.1083/jcb.201009067. PubMed PMID: 21220506; PubMed Central PMCID: PMC3019556.
64. Ichimura Y, Kumanomidou T, Sou YS, Mizushima T, Ezaki J, Ueno T, et al. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem*. 2008;283(33):22847-57. doi: 10.1074/jbc.M802182200. PubMed PMID: 18524774.
65. Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem*. 2010;285(29):22576-91. doi: 10.1074/jbc.M110.118976. PubMed PMID: 20452972; PubMed Central PMCID: PMC3019556.
66. Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol*. 2010;12(3):213-23. doi: 10.1038/ncb2021. PubMed PMID: 20173742.
67. Houslay MD, Christian F. p62 (SQSTM1) forms part of a novel, reversible aggregate containing a specific conformer of the cAMP degrading phosphodiesterase, PDE4A4. *Autophagy*. 2010;6(8):1198-200. doi: 10.4161/auto.6.8.13479. PubMed PMID: 20864809.
68. Rantanen K, Pursiheimo JP, Hogel H, Miikkulainen P, Sundstrom J, Jaakkola PM. p62/SQSTM1 regulates cellular oxygen sensing by attenuating PHD3 activity through aggregate sequestration and enhanced degradation. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 5):1144-54. doi: 10.1242/jcs.115667. PubMed PMID: 23345396.
69. Belaid A, Ndiaye PD, Klionsky DJ, Hofman P, Mograbi B. Signalphagy: scheduled signal termination by macroautophagy. *Autophagy*. 2013;9(10):1629-30. Epub 2013/09/06. doi: 10.4161/auto.25880. PubMed PMID: 24004837; PubMed Central PMCID: PMC3019556.

70. Matsumoto G, Wada K, Okuno M, Kurosawa M, Nukina N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell*. 2011;44(2):279-89. doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.039. PubMed PMID: 22017874.
71. Klebig C, Korinth D, Meraldi P. Bub1 regulates chromosome segregation in a kinetochore-independent manner. *J Cell Biol*. 2009;185(5):841-58. Epub 2009/06/03. doi: 10.1083/jcb.200902128. PubMed PMID: 19487456; PubMed Central PMCID: PMC2711590.
72. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G 2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle*. 2014;13(9):1400-12. Epub 2014/03/15. doi: 10.4161/cc.28401. PubMed PMID: 24626186; PubMed Central PMCID: PMC4050138.
73. Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation. *Mol Cell Biol*. 2004;24(18):8055-68. Epub 2004/09/02. doi: 10.1128/MCB.24.18.8055-8068.2004. PubMed PMID: 15340068; PubMed Central PMCID: PMC4050138.
74. Wooten MW, Geetha T, Babu JR, Seibenhener ML, Peng J, Cox N, et al. Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*. 2008;283(11):6783-9. Epub 2008/01/05. doi: 10.1074/jbc.M709496200. PubMed PMID: 18174161.
75. Wurzer B, Zaffagnini G, Fracchiolla D, Turco E, Abert C, Romanov J, et al. Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *eLife*. 2015;4:e08941. Epub 2015/09/29. doi: 10.7554/eLife.08941. PubMed PMID: 26413874; PubMed Central PMCID: PMC4684078.
76. Haslbeck M, Vierling E. A first line of stress defense: small heat shock proteins and their function in protein homeostasis. *Journal of molecular biology*. 2015;427(7):1537-48. Epub 2015/02/15. doi: 10.1016/j.jmb.2015.02.002. PubMed PMID: 25681016; PubMed Central PMCID: PMC4360138.
77. Finka A, Mattoo RU, Goloubinoff P. Experimental Milestones in the Discovery of Molecular Chaperones as Polypeptide Unfolding Enzymes. *Annual review of biochemistry*. 2016;85:715-42. Epub 2016/04/07. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014124. PubMed PMID: 27050154.
78. Woodruff JB. Assembly of Mitotic Structures through Phase Separation. *Journal of molecular biology*. 2018;430(23):4762-72. Epub 2018/05/12. doi: 10.1016/j.jmb.2018.04.041. PubMed PMID: 29751016.
79. Boeynaems S, Alberti S, Fawzi NL, Mittag T, Polymenidou M, Rousseau F, et al. Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends Cell Biol*. 2018;28(6):420-35. Epub 2018/04/01. doi: 10.1016/j.tcb.2018.02.004. PubMed PMID: 29602697; PubMed Central PMCID: PMC6034118.
80. Aguzzi A, Altmeyer M. Phase Separation: Linking Cellular Compartmentalization to Disease. *Trends Cell Biol*. 2016;26(7):547-58. Epub 2016/04/08. doi: 10.1016/j.tcb.2016.03.004. PubMed PMID: 27051975.
81. Shemetov AA, Gusev NB. Biochemical characterization of small heat shock protein HspB8 (Hsp22)-Bag3 interaction. *Arch Biochem Biophys*. 2011;513(1):1-9. Epub 2011/07/20. doi: 10.1016/j.abb.2011.06.014. PubMed PMID: 21767525.
82. Sun D, Wu R, Zheng J, Li P, Yu L. Polyubiquitin chain-induced p62 phase separation drives autophagic cargo segregation. *Cell research*. 2018;28(4):405-15. Epub 2018/03/07. doi: 10.1038/s41422-018-0017-7. PubMed PMID: 29507397; PubMed Central PMCID: PMC5939046.
83. Zaffagnini G, Savova A, Danieli A, Romanov J, Tremel S, Ebner M, et al. p62 filaments capture and present ubiquitinated cargos for autophagy. *EMBO J*. 2018. Epub 2018/01/19. doi: 10.15252/embj.201798308. PubMed PMID: 29343546.
84. Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, et al. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Mol Cell*. 2013;51(5):618-31. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003. PubMed PMID: 24011591.
85. Loukil A, Zonca M, Rebouissou C, Baldin V, Coux O, Biard-Piechaczyk M, et al. High-resolution live-cell imaging reveals novel cyclin A2 degradation foci involving autophagy. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 10):2145-50. Epub 2014/03/19. doi: 10.1242/jcs.139188. PubMed PMID: 24634511.
86. Loukil A, Izard F, Georgieva M, Mashayekhan S, Blanchard JM, Parmeggiani A, et al. Foci of cyclin A2 interact with actin and RhoA in mitosis. *Scientific reports*. 2016;6:27215. Epub 2016/06/10. doi: 10.1038/srep27215. PubMed PMID: 27279564; PubMed Central PMCID: PMC4899731.
87. Mathiassen SG, De Zio D, Cecconi F. Autophagy and the Cell Cycle: A Complex Landscape. *Frontiers in oncology*. 2017;7:51. Epub 2017/04/15. doi: 10.3389/fonc.2017.00051. PubMed PMID: 28409123; PubMed Central PMCID: PMC5374984.

88. Jones HW, Jr., McKusick VA, Harper PS, Wuu KD. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol.* 1971;38(6):945-9. PubMed PMID: 4942173.
89. Gassmann R, Holland AJ, Varma D, Wan X, Civil F, Cleveland DW, et al. Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells. *Genes Dev.* 2010;24(9):957-71. Epub 2010/05/05. doi: 10.1101/gad.1886810. PubMed PMID: 20439434; PubMed Central PMCID: PMC2861194.
90. Champagne C, Landry MC, Gingras MC, Lavoie JN. Activation of adenovirus type 2 early region 4 ORF4 cytoplasmic death function by direct binding to Src kinase domain. *J Biol Chem.* 2004;279(24):25905-15. PubMed PMID: 15070897.
91. Landry MC, Sicotte A, Champagne C, Lavoie JN. Regulation of cell death by recycling endosomes and golgi membrane dynamics via a pathway involving Src-family kinases, Cdc42 and Rab11a. *Mol Biol Cell.* 2009;20(18):4091-106. Epub 2009/07/31. doi: 10.1091/mbc.E09-01-0057. PubMed PMID: 19641023; PubMed Central PMCID: PMC2743627.
92. Lavoie JN, Champagne C, Gingras MC, Robert A. Adenovirus E4 open reading frame 4-induced apoptosis involves dysregulation of src family kinases. *J Cell Biol.* 2000;150(5):1037-56.
93. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry.* 1996;68(5):850-8. Epub 1996/03/01. PubMed PMID: 8779443.
94. Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical chemistry.* 2003;75(6):1300-6. Epub 2003/03/28. PubMed PMID: 12659189.

2.9. Supporting information captions and supplementary methods

S1 Movie; related to Fig. 3B. Spindle dynamics in control HeLa-RFP-H2B cells. Video microscopy of a representative HeLa-RFP-H2B cells transfected with control siRNA (siCtl) and expressing low levels of RFP- α -tubulin. Mitotic cells were imaged for a 75 min-period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 2 frames/sec. (MOV)

S2 Movie; related to Fig. 3B. BAG3 depletion induces abnormal mitotic spindle dynamics. Video microscopy of a representative siBAG3-treated HeLa-RFP-H2B cells (siBAG3#3) expressing low levels of RFP- α -tubulin, and which shows characteristic mitotic spindle rocking upon depletion of BAG3. Mitotic cells were imaged for a 75 min-period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 2 frames/sec. (MOV)

S3 Movie; related to Fig. 3B. Expression of wild type BAG3-GFP in BAG3-depleted cells rescues mitotic spindle dynamics. Video microscopy of a representative siBAG3-treated HeLa-RFP-H2B cells (siBAG3#3) expressing BAG3-GFP_WT and low levels of RFP- α -tubulin and which shows normal mitotic spindle dynamics. Mitotic cells were imaged for a 75 min-period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 2 frames/sec. (MOV)

S4 Movie; related to Fig. 3C. Expression of the quadruple phosphorylation mutant of BAG3-GFP in BAG3-depleted cells is associated with aberrant mitotic spindle dynamics. Video microscopy of a representative siBAG3-treated HeLa-RFP-H2B cells (siBAG3#3) expressing BAG3-GFP_QMB and low levels of RFP- α -tubulin and which shows mitotic spindle rocking. Mitotic cells were imaged for a 75 min-period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 2 frames/sec. (MOV)

S5 Movie; related to Fig. 3B. Expression of the double phosphorylation mutant of BAG3-GFP in BAG3-depleted cells shows defects in mitotic spindle dynamics. Video microscopy of a representative siBAG3-treated HeLa-RFP-H2B cells (siBAG3#3) expressing BAG3-GFP_DMB and low levels of RFP- α -tubulin and which shows mitotic spindle rocking. Mitotic cells were imaged for a 75 min-period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 2 frames/sec. (MOV)

S6 Movie; related to Fig. 3B. Expression of the phospho-mimetic mutant of BAG3-GFP in BAG3-depleted cells shows aberrant spindle dynamics. Video microscopy of a representative siBAG3-treated HeLa-RFP-H2B cells (siBAG3#3) expressing BAG3-GFP_T285D and low levels of RFP- α -tubulin and which shows mitotic spindle rocking. Mitotic cells were imaged for a 75 min-period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 2 frames/sec. (MOV)

Mass Spectrometry and phospho-peptides analyses

Samples Preparation

HEK 293T transfected with myc-BAG3 were treated or not with nocodazole (400 ng/ml 16 hours), collected using PBS-15 mM citrate-0.6mM EDTA, and lysed in 10 volumes of modified RIPA buffer (TRIS-HCl 50 mM pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Igepal, 1X complete w/o EDTA (Roche), 10 mM NaF, 1 mM Sodium vanadate, 40 mM β -glycerophosphate). After centrifugation at 15000 g 15 minutes, supernatants were incubated 60 min with an anti-myc antibody. Immune complexes were absorbed on Dynabeads-protein G (Invitrogen) during 30 min, washed on magnet 3 times with RIPA buffer and briefly separated on SDS-PAGE. BAG3 protein bands were revealed with Coomassie Blue R250 and excised for protein-in-gel digestion. The bands of interest from SDS-PAGE were placed in 96-well plates and then washed with water. Tryptic digestion was performed on a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, USA) according to standard methods [93], with modifications as suggested [94]. Briefly, proteins were reduced with 10mM DTT and alkylated with 55mM iodoacetamide. Trypsin digestion was performed using 126nM of modified porcine trypsin (Sequencing grade, Promega, Madison, WI) at 58°C for 1h. Digestion products were extracted using 1% formic acid, 2% acetonitrile followed by 1% formic acid, 50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, vacuum centrifuge dried and then resuspended into 10 μ l of 0.1% formic acid, and 2 μ l were analyzed by mass spectrometry.

In-gel digestion and mass spectrometry were performed at the CHU de Québec-Université Laval Research Center Proteomics Platform Center.

Mass Spectrometry

Peptide samples were separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray mass spectrometry (ES MS/MS). Agilent 1200 nano pump connected to a 5600 Triple-TOF mass spectrometer was used (AB Sciex, Framingham, MA, USA), equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptide separation was performed on a self-packed PicoFrit column (New Objective, Woburn, MA) packed with Jupiter (Phenomenex) 5 μ , 300A C18, 15 cm x 0.075 mm internal diameter. Peptides were eluted with a linear gradient from 2-50% solvent B (acetonitrile, 0.1% formic acid) in 30 min, at 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Analyst software version 1.6. Each full scan mass spectrum (400 to 1250 m/z) was followed by collision-induced dissociation of the twenty most intense ions. Dynamic exclusion was set for a period of 3 sec and a tolerance of 100 ppm.

Database Searching and Criteria for Protein Identification

All MS/MS peak lists (MGF files) were generated using ProteinPilot (AB Sciex, Framingham, MA, USA, Version 4.5) with the paragon algorithm. MGF sample files were then analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.4.0) and Tandem (The GPM, thegpm.org; version CYCLONE (2010.12.01.1)). Mascot was set up to search the TAX-HomoSapiens-9606 (November 2014) database. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0.10 Da and a parent ion tolerance of 0.10 Da. For BAG3 phosphorylated amino acid determination, carbamidomethyl of cysteine was specified in Mascot as a fixed modification, dehydrated of the n-terminus, glu->pyro-Glu of the n-terminus, ammonia-loss of the n-terminus, gln->pyro-Glu of the n-terminus, deamidated of asparagine and glutamine, oxidation of methionine and phospho of serine, threonine and tyrosine were specified as variables modifications. Glu->pyro-Glu of the n-terminus, gln->pyro-Glu of the n-terminus, deamidated of asparagine and glutamine, oxidation of methionine and phosphorylation of serine, threonine and tyrosine were specified in Mascot as variable modifications. Two missed cleavages were allowed. Scaffold PTM (Proteome Software, Portland, Oregon, USA) was used to annotate Post Translational Modification (PTM) sites contained in MS/MS spectra. The program utilizes the ASCORE's probabilistic approach and scoring technique [52].

Chapitre 3: Analyse fonctionnelle comparative de la phosphorylation de BAG3 sur T285, S386 et S195 de la transition G2/M à la mitose.

3.1. Introduction

Les résultats présentés dans le chapitre 2 indiquent que BAG3 est phosphorylée pendant la mitose sur le résidu T285 par la kinase CDK1 et que la mutation de ce résidu en alanine non-phosphorylable phénocopie la déplétion de BAG3 dans les cellules mitotiques. Ces résultats démontrent que la phosphorylation de BAG3 sur T285 régule les fonctions mitotiques de BAG3 qui facilitent l'arrondissement mitotique et le positionnement du fuseau mitotique, ainsi que l'assemblage de « *p62 bodies* » mitotiques (MIBS ; chapitre 2, fig. 2.3 et 2.5). Cependant, les analyses par spectrométrie de masse (MS), incluant celles présentées dans le chapitre 2 de cette thèse, de même que celles publiées par d'autres groupes (Dephoure et al. 2008; Olsen et al. 2010; Kettenbach et al. 2011; *phosphosite.org*), ont identifié plusieurs autres sites potentiels de phosphorylation mitotique, incluant S195 et S386. Ainsi, l'objectif principal de ce chapitre, sera de déterminer si ces sites de phosphorylation sont fonctionnellement importants et s'ils pourraient conférer à BAG3 une spécificité de fonction.

Les résultats qui seront présentés suggèrent une modulation site-spécifique de phosphorylation de BAG3 entre la phase G2/M et la mitose. Ces phosphorylations différentielles moduleraient les propriétés mitotiques de BAG3, c'est à dire sa localisation, ses fonctions dans l'arrondissement mitotique et l'orientation du fuseau mitotique et potentiellement son association avec ses partenaires d'interaction.

3.2. Le résidu S386 de BAG3 est phosphorylé par la kinase CDK1 pendant la mitose et régule l'arrondissement des cellules mitotiques et l'assemblage moléculaire des MIBS.

3.2.1. BAG3 est phosphorylée sur la S386 de l'entrée des cellules en mitose jusqu'à la transition métaphase-anaphase de manière dépendante de l'activité de la kinase CDK1.

Parmi les résidus potentiellement phosphorylés sur BAG3 dans les cellules mitotiques, les résidus S385 et S386, sont situés dans le domaine riche en proline PxxP et localisés dans un site consensus pour la kinase CDK1 (spectres de MS présentés fig. 3.1C). Puisque le domaine PxxP est important pour les fonctions mitotiques de BAG3 (Fuchs et al, 2015, annexe 1, fig. 4F), nous avons donc voulu déterminer si ces phosphorylations ont un impact fonctionnel sur l'activité du co-chaperon.

Bien que les ASCORE soient inférieurs au « *cutoff* » (considéré à 20 actuellement), ces résidus sont également répertoriés sur *phosphosite.org* (de 20 à 30 fois) et la S386 a été identifiée dans des analyses de MS quantitatives qui s'intéressent au phosphoproteome mitotique (Dephoure et al. 2008; Olsen et al. 2010; Kettenbach et al. 2011).

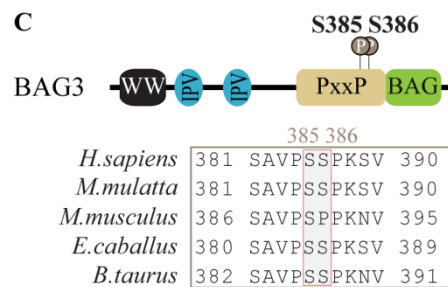
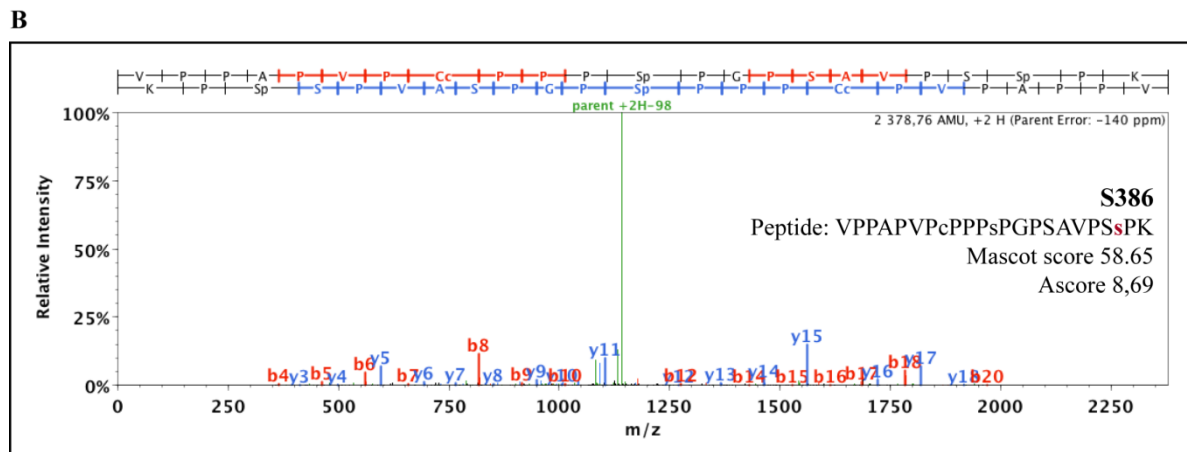
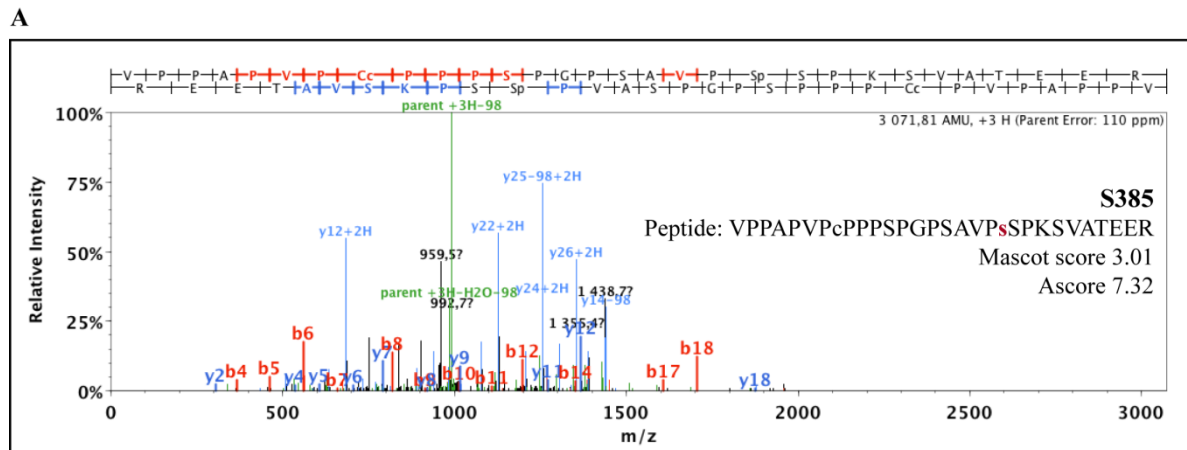


Figure 3.1 : Identification des sites de phosphorylation S385 et S386 durant la mitose par spectrométrie de masse. (A, B) Spectres MS/MS représentatifs pour les phosphopeptides contenant les résidus S385 (A) et S386 (B). Les scores de Mascott pour l'identification des peptides et d'ASCORE pour la localisation du site phosphorylé sont indiqués dans les panels. Un peptide contenant S385 a été trouvé et un total de trois peptides ont été trouvés pour S386. m/z, masse sur charge. BAG3 a été immunoprécipitée à partir d'extraits de cellules

HeLa asynchrones ou synchronisées en mitose avec du nocodazole (400 ng/ml, 16h), puis digérées à la trypsine pour procéder aux analyses LC-MS/MS. (C) Représentation schématique de BAG3 avec ses différents domaines d'interactions protéiques, les phosphorylations S385 et S386 identifiées par MS et les alignements de séquences montrant la conservation inter-espèce de ces deux résidus.

Afin de confirmer la phosphorylation de BAG3 sur S386 de façon dépendante des signaux mitotiques, nous avons généré un anticorps phospho-spécifique dirigé contre la S386 phosphorylée de BAG3. De la même manière que le résidu T285, nous avons testé la spécificité de cet anticorps par immunobuvardages après 1) déplétion par siARN de BAG3 dans des cellules HeLa-RFP-H2B asynchrones ou mitotiques et 2) immunoprécipitation des protéines BAG3-GFP sauvage (WT) ou non-phosphorylable pour les résidus S284 et T285 (S284A-T285A) ou S385 et S386 (S385A-S386A) dans des cellules HeLa-RFP-H2B mitotiques (fig. 3.2). La S385 adjacente à la S386 a été mutée également puisque ce résidu a été identifié comme phosphorylé en MS (fig. 3.1A).

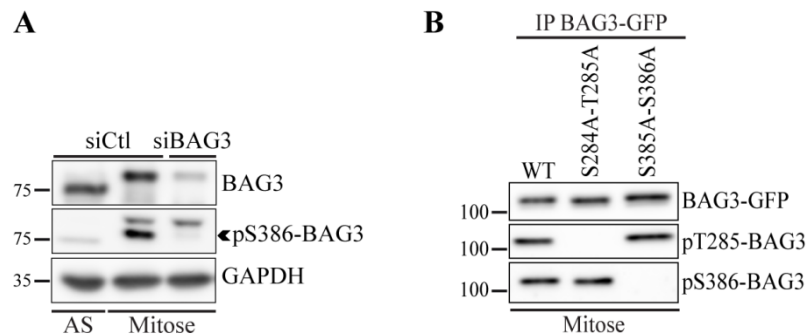


Figure 3.2 : BAG3 est phosphorylée sur S386 en mitose.

(A) Immunobuvardage de type « Western » (WB) représentatif montrant la spécificité de l'anticorps anti-pS386-BAG3. Les cellules HeLa transfectées avec un siRNA spécifique de BAG3 (siBAG3#1) ou contrôle, ont été synchronisées en mitose par un traitement au nocodazole de 16 h (200 ng/ml). Les cellules mitotiques ont été récupérées par agitation mécanique et lysées pour procéder à l'analyse par WB; des anticorps anti-BAG3 et anti-pS386-BAG3 ont été utilisés; GAPDH: contrôle de dépôt. AS: cellules asynchrones. Extraits provenant de la même expérience que présentée à la fig. 2.1C. (B) Immunoprécipitation (IP) de BAG3-GFP_WT ou des mutants non phosphorylables montrant la spécificité des anticorps anti-pT285-BAG3 et anti-pS386-BAG3. Les IP BAG3 ont été réalisées à partir de cellules HeLa-RFP-H2B synchronisées en mitose par un traitement au nocodazole (200 ng/ml), infectées par des adénovirus recombinants entraînant l'expression de protéines BAG3-GFP, WT ou non phosphorylable (S284A-T285A et S385A-S386A) et récupérées par agitation mécanique. Les extraits cellulaires ont été traités pour IP en utilisant un anticorps anti-GFP et analysés par WB avec des anticorps anti-BAG3, anti-pT285-BAG3 et anti-pS386-BAG3. *Extraits provenant de la même expérience que présentée à la fig. 2.1D.*

Dans les extraits totaux où l'expression de BAG3 a été diminuée, nous avons observé une faible bande à la hauteur du poids moléculaire de BAG3 dans les extraits asynchrones avec l'anticorps anti-pS386-BAG3, dont le signal augmente dans les extraits mitotiques (fig. 3.2A). De plus, la bande mitotique est fortement réduite suivant la déplétion de BAG3, ce qui corrobore la spécificité de l'anticorps pour la forme phosphorylée de BAG3 (fig. 3.2A). Les immunoprécipitations des

protéines BAG3-GFP ont révélé que BAG3-GFP_WT est reconnue par les deux anticorps phospho-spécifiques pT285-BAG3 et pS386-BAG3 (fig. 3.2B). En revanche, aucun signal a été détecté par l'anticorps anti-pS386-BAG3 en présence du mutant S385A-S386A tandis qu'un signal a été détecté avec le mutant S284A-T285A (fig. 3.2B). Ceci montre la spécificité de l'anticorps pour la phosphorylation sur S386 de BAG3. Inversement, nous avons observé un signal avec l'anticorps anti-pT285-BAG3 en présence du mutant S385A-S386A (fig. 3.2B). De façon importante, ces observations suggèrent que les événements de phosphorylation sur T285 et S386 seraient indépendants : la phosphorylation de l'un des résidus ne semble pas être un pré-requis pour la phosphorylation de l'autre puisque la mutation de l'un n'affecte pas la phosphorylation de l'autre.

Nous avons ensuite évalué la cinétique de phosphorylation du résidu S386 pendant la progression mitotique. Pour ce faire, des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en prophase par blocage au nocodazole et ont été relâchées dans du milieu frais pour différents temps. L'analyse par immunobuvardage a montré qu'un signal pS386-BAG3 est détecté à T0, suivi d'une diminution progressive de celui-ci à T30 et T60, en corrélation avec la diminution du signal cycline B (fig. 3.3). Ce résultat suggère que, tout comme T285, la phosphorylation de la S386 de BAG3 augmenterait à l'entrée des cellules en mitose et serait rapidement réduite à la transition métaphase-anaphase.

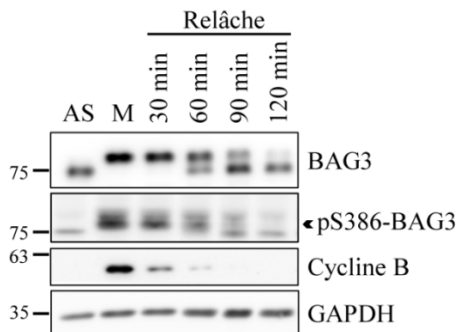


Figure 3.3 : BAG3 est phosphorylée sur S386 de l'entrée des cellules en mitose jusqu'à la transition métaphase-anaphase.

WB représentatif du suivi de la cinétique de phosphorylation mitotique du résidu S386 de BAG3 dans les cellules HeLa-RFP-H2B. Les cellules mitotiques ont été collectées par agitation mécanique après un blocage à la thymidine (2 mM, 18 h), suivi d'une relâche de 8 h, et un traitement au nocodazole (200 ng/ml, 16 h), puis remises en culture dans du milieu frais sans nocodazole. Les cellules ont été récoltées à différents moments (de 0 à 120 minutes) et lysées pour une analyse en WB. Les anticorps anti-BAG3, anti-pS386-BAG3 et anti-cycline B (contrôle du cycle cellulaire) ont été utilisés; GAPDH: contrôle de dépôt. AS : cellules asynchrones, M : cellules mitotiques. *WB BAG3, cycline B1 et GAPDH identiques à la fig. 2.1G.*

Afin d'analyser la contribution de kinases mitotiques sur le maintien de la phosphorylation de la S386, des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose par traitement au nocodazole et incubées avec différents inhibiteurs sélectifs de kinases durant la dernière heure de traitement au nocodazole (fig. 3.4A) ou synchronisées en mitose par traitement au nocodazole et arrêtées en G2/M par traitement au RO3306 (fig. 3.4B).

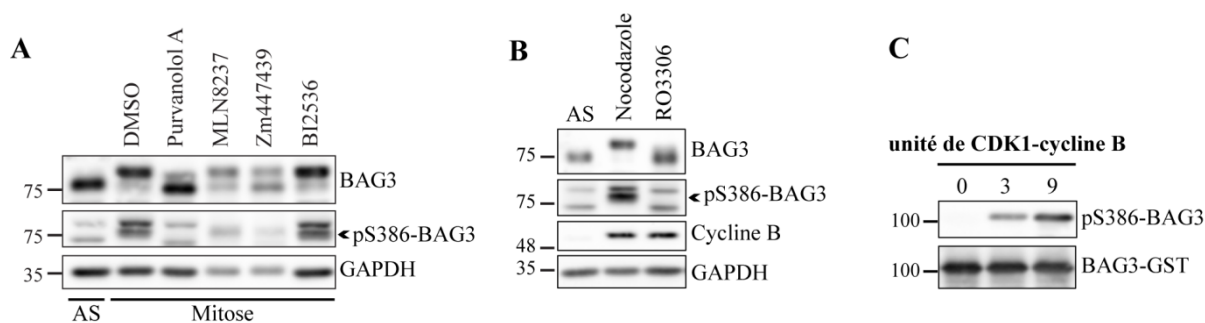


Figure 3.4 : Le résidu S386 de BAG3 est phosphorylé directement par la kinase CDK1.

(A) WB représentatif montrant l'effet des inhibiteurs de kinases sur la phosphorylation de la S386 de BAG3. Les cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées par un blocage à la thymidine (2 mM, 18 h) suivi d'une relâche de 8 h puis d'un blocage au nocodazole (200 ng/ml, 12h). Pendant la dernière heure de traitement au nocodazole, des inhibiteurs de kinases Purvanolol A (CDK, 10 μ M), MLN8237 (Aurora A, 1 μ M), Zm447439 (Aurora A et B, 10 μ M) et BI2536 (PLK1, 1 μ M), ont été ajoutés. Les cellules mitotiques ont été récupérées par agitation mécanique et préparées pour les WB. Les anticorps anti-BAG3 et anti-pS386-BAG3 ont été utilisés; GAPDH: contrôle de dépôt. À noter : dépôt plus faible pour les conditions MLN8237 et Zm447439. Représentatif de 4 expériences. (B) WB montrant que la phosphorylation du résidu S386 de BAG3 n'est pas détectée dans des cellules en G2/M où l'activité de CDK1 est inhibée par le RO3306. Des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en G2/M avec du RO3306 (8 μ M, 18 h) ou en mitose avec du nocodazole (400 ng/ml, 16 h). Les extraits cellulaires ont été préparés à partir des cellules en mitose récupérées par agitation mécanique. Des analyses par WB à partir des extraits cellulaires obtenus ont été réalisées avec les anticorps indiqués. Cycline B1 sert de contrôle du cycle cellulaire ; GAPDH : contrôle de dépôt. Représentatif de 5 expériences. (C) WB représentatif montrant la phosphorylation *in vitro* du résidu S386 de BAG3 par CDK1-cycline B1. BAG3-GST recombinante a été purifiée et incubée avec une quantité croissante de CDK1-cycline B1 et ATP pendant 60 min à 30°C. Les protéines ont été détectées par WB avec des anticorps anti-BAG3 et anti-pS386-BAG3. Représentatif de 5 expériences.

Nous avons observé que le retard de migration sur gel de BAG3, ainsi que le signal phospho-spécifique pour la S386, ont été abolis dans les cellules mitotiques traitées avec un inhibiteur des CDK (Purvanolol A, fig. 3.4A). En outre, le traitement des cellules au RO3306, qui est un inhibiteur sélectif de CDK1 et induit un arrêt des cellules en G2/M, bloque la phosphorylation du résidu S386 de BAG3 (fig. 3.4B). Ces résultats suggèrent que le maintien de la phosphorylation sur S386 nécessite l'activité de CDK1. Comme observé pour la T285 (chapitre 2, fig. 2.2A), l'inhibition d'Aurora A (MLN8732, fig. 3.4A) a réduit partiellement le retard de migration sur gel de BAG3 et le signal pS386-BAG3. L'inhibition d'Aurora A et B (Zm447439, fig. 3.4A) a un effet qui semble encore plus important tant sur le retard de migration que le signal phospho-spécifique pour S386. Enfin, l'inhibition de PLK1 (BI2536, fig. 3.4A) n'a pas impacté la phosphorylation de BAG3 sur la

S386. Ces résultats suggèrent que l'activité d'Aurora A et B participe partiellement au maintien de la phosphorylation de la S386 de BAG3 (fig. 3.4A). En outre, des essais kinase *in vitro* indiquent que CDK1 peut phosphoryler directement la S386 sur BAG3 (fig. 3.4C). En effet, un signal a été détecté en présence de CDK1-cycline B1 avec l'anticorps pS386-BAG3. Ensemble, ces résultats suggèrent que BAG3 est phosphorylée pendant la mitose sur le résidu S386 par CDK1-cycline B.

En conclusion, ces résultats suggèrent que de la même manière que la T285 (chapitre 2, fig. 2.1 et 2.2), la phosphorylation de la S386 de BAG3 serait promue à l'entrée des cellules en mitose par CDK1 et serait diminuée à la transition métaphase-anaphase, en corrélation avec la diminution d'activité de cette kinase à ce stade.

3.2.2. La phosphorylation de BAG3 sur la S386 facilite l'arrondissement des cellules mitotiques et la formation des MIBS mais n'a pas d'impact sur le positionnement du fuseau mitotique.

Afin d'évaluer la contribution fonctionnelle de la phosphorylation de la S386 sur les fonctions mitotiques de BAG3, des expériences de déplétion-restauration de phénotypes ont été réalisées pour analyser un impact potentiel d'un mutant non phosphorylable sur S386 sur l'arrondissement mitotique d'une part et le positionnement du fuseau mitotique d'autre part (fig. 3.5).

Pour ce faire, des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose par double blocage à la thymidine après déplétion de BAG3 endogène et expression de protéines BAG3-GFP_WT ou S385A-S386A en utilisant des adénovirus recombinants (méthode décrite dans Fuchs et al. 2016). Les cellules ont été analysées par immunofluorescence pour le phénotype d'arrondissement ou par microscopie en cellules vivantes exprimant α -tubuline-RFP pour visualiser le fuseau mitotique (fig. 3.5).

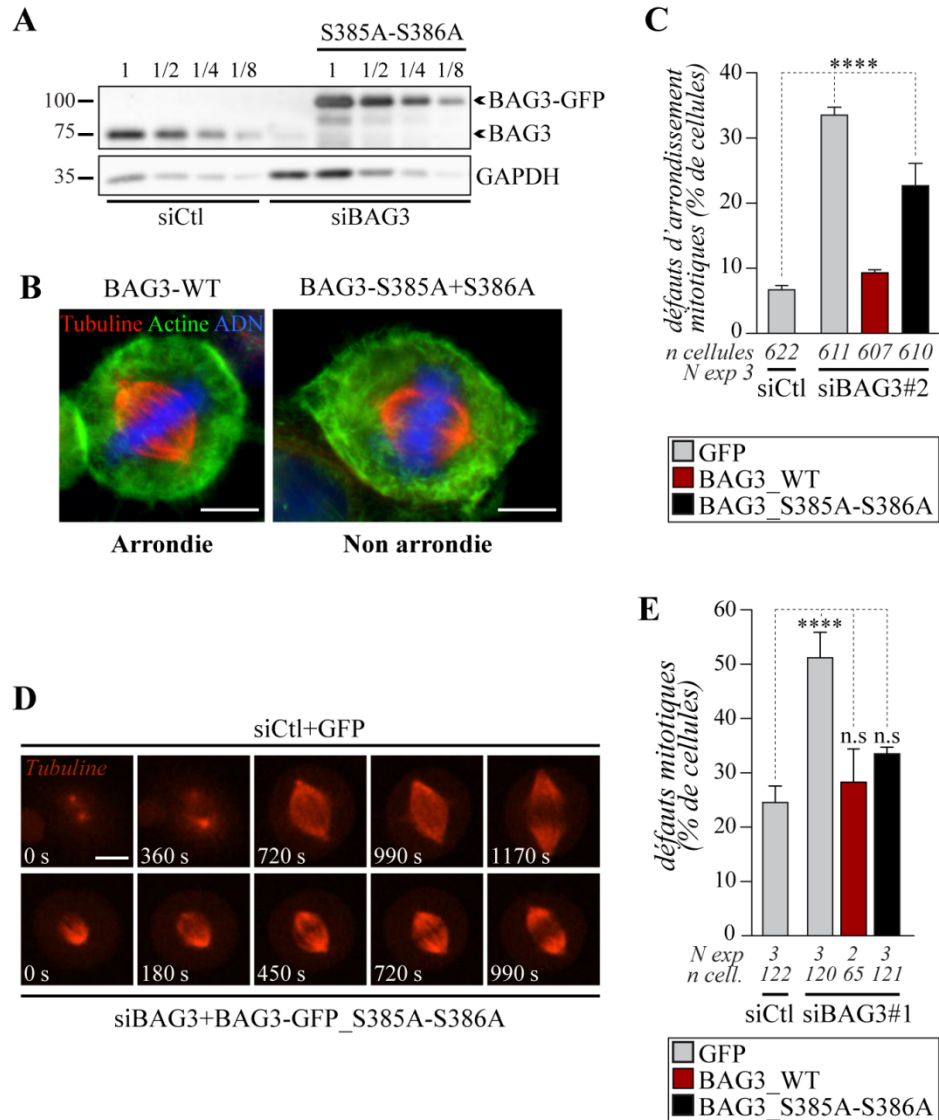


Figure 3.5 : La mutation du résidu S386 de BAG3 en alanine non phosphorylable n'affecte pas le positionnement du fuseau mitotique mais induit des défauts d'arrondissement des cellules suivant la déplétion de BAG3 pendant la mitose.

(A à E) Expériences de déplétion-restauration de phénotypes où des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose par la méthode de double blocage à la thymidine (2 mM, 16 h) et infectées avec des adénovirus recombinants conduisant l'expression des protéines BAG3-GFP suivant la déplétion sur 48 h de BAG3 endogène à l'aide d'un siARN spécifique ciblant la région 3'UTR. (A) WB représentatif montrant le niveau de déplétion de BAG3 endogène et le niveau d'expression de protéines BAG3-GFP_S385A-S386A. Les extraits cellulaires totaux ont été préparés 48 h après la transfection de siRNA et analysés par WB avec un anticorps anti-BAG3. Notez que les niveaux de BAG3 endogène sont diminués de > 75% ; GAPDH : contrôle de dépôt. (B-C) Les cellules HeLa-RFP-H2B ont été traitées pour IF avec un anticorps anti- α -tubuline (fuseau mitotique), phalloïdine (F-actine) et Hoechst (ADN); Barres, 10 μ m. (B) Images d'épifluorescence montrant des cellules mitotiques arrondies (siCtl) comparées à des cellules mitotiques partiellement arrondies (siBAG3#5). Les conditions siCtl+GFP, siBAG3+GFP et siBAG3+WT sont identiques que la fig. 2.3E (chapitre 2). (C) Le graphique représente le pourcentage de cellules présentant des défauts d'arrondissement mitotiques en (B); Moyennes \pm SEM représentatives de 3 expériences indépendantes où 607 à 622 cellules ont été quantifiées. L'analyse statistique a été réalisée par le test exact de Fisher et ****, $p < 0,0001$ compare siCtl + GFP à siBAG3#5 + GFP et siBAG3#5 + S385A-S386A; ns, $p = 0,1929$ compare siCtl + GFP et

siBAG3#5 + WT. **(D-E)** Les cellules en mitose ont été infectées avec du baculovirus recombinant conduisant l'expression de α -tubuline-RFP puis imagées par un microscope confocal de type « *spinningdisk* » pendant 75 minutes avec un intervalle de ~ 1.5 min. **(D)** Séquence d'images confocales représentatives suivies dans le temps de α -tubuline-RFP montrant la restauration de la dynamique du fuseau mitotique par la réintroduction de BAG3-GFP_WT et de BAG3-GFP_S385A-S386A dans des cellules déplétées en BAG3 (siBAG3#3). **(E)** Quantification des cellules mitotiques en (B) indiquant le pourcentage de cellules avec des défauts mitotiques définis par des rotations du fuseau mitotique +/- un délai de la progression des cellules en mitose. Moyennes +/- SEM représentatives de 2 à 3 expériences indépendantes où 65 à 122 cellules ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher et ****, $p < 0.0001$ compare siCtl+GFP à siBAG3#3+GFP ; ns, $p = 0,0904$ compare siCtl+GFP et siBAG3#3+S385A-S386A.

Comme démontré précédemment, la déplétion de BAG3 endogène a conduit à une augmentation significative du pourcentage de cellules mitotiques avec des défauts, tant des défauts d'arrondissement ($\sim 35\%$ (+/- 1,6%) de défauts versus 6,4% (+/- 0,8%) dans les conditions contrôles, fig. 3.5B et C) que des rotations du fuseau mitotique ($\sim 51,3\%$ (+/- 4,7%) comparé aux cellules contrôles $\sim 25\%$ (+/- 3%), fig. 3.5D et E). L'expression de BAG3-GFP_WT dans les cellules dépourvues en BAG3 a induit une restauration des niveaux de défauts mitotiques, tant arrondissement que positionnement du fuseau mitotique, proche du niveau observé dans les cellules contrôles (fig. 3.5B à E). En contraste, une persistance des défauts d'arrondissement mitotique a été observée suivant l'expression du mutant BAG3-GFP_S385A-S386A dans les cellules dépourvues en BAG3 ($\sim 25\%$ (+/- 4,5%), fig. 3.5B et C). De manière surprenante, ce mutant a diminué significativement les défauts de positionnement du fuseau mitotique, proche du niveau de restauration de phénotype dans les cellules exprimant BAG3-GFP_WT ($\sim 33,6\%$ (+/- 1,2%), fig. 3.5D et E). Ces résultats suggèrent alors que la phosphorylation de ces résidus est importante dans la régulation du processus d'arrondissement des cellules mitotiques mais ne semble pas avoir d'effet fonctionnel dans le processus de positionnement du fuseau mitotique.

Concernant l'assemblage moléculaire de p62 au sein des MIBS identifiés dans le chapitre 2, des expériences de déplétion-restauration du phénotype ont été réalisées utilisant les lignées cellulaires HeLa-Flp-In TRex dans lesquelles l'expression de BAG3-GFP est inducible. Les cellules ont été synchronisées en mitose par la méthode du double blocage à la thymidine, transfectées avec un siARN spécifique dirigé contre BAG3 et l'expression de GFP, BAG3-GFP_WT ou S385A-S386A a été induite à des niveaux proches de BAG3 endogène. Le nombre de MIBS par cellule a été quantifié sur cellules fixées (fig. 3.6).

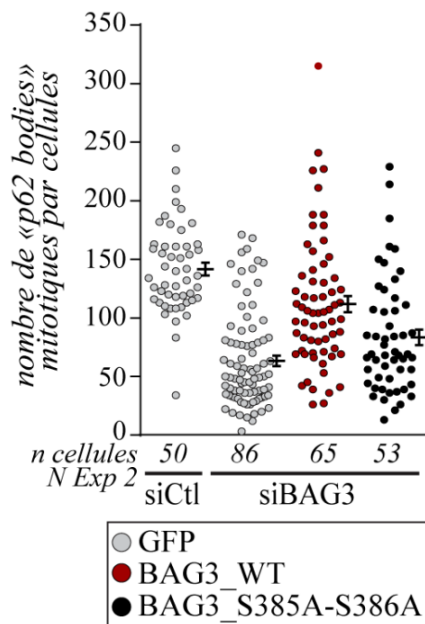


Figure 3.6 : La mutation du résidu S386 de BAG3 en alanine non phosphorylable perturbe l'assemblage moléculaire des « p62 bodies » pendant la mitose.

Graphique montrant le nombre de MIBS quantifiés dans les cellules HeLa-Flp-in-TREx mitotiques appauvries en BAG3 et exprimant les protéines GFP, BAG3-GFP_WT et BAG3-GFP_S385A-S386A. Des cellules HeLa-Flp-in-TREx ont été synchronisées en mitose avec la méthode du double blocage à la thymidine et l'expression exogène de BAG3-GFP a été induite durant le premier blocage avec la doxycycline (10 ng/ml, 16 h). Le niveau endogène de BAG3 a été réduit en utilisant un siARN spécifique de BAG3 (siBAG3#5) pendant 48 h. Les cellules ont été fixées et traitées pour l'immunofluorescence de p62 endogène avec un anticorps anti-p62 et l'ADN a été marqué avec le Hoechst. Le nombre de MIBS a été quantifié à partir de cellules mitotiques individuelles dans chaque condition; Moyennes +/- SEM représentatives de 2 expériences (N Exp) indépendantes où 50 à 86 cellules (n cellules) ont été quantifiées. Les conditions siCtl+GFP, siBAG3#5+GFP et siBAG3#5+WT sont identiques à la fig. 2.5G. L'analyse statistique a été effectuée par le test Kruskal Wallis et ****, $p < 0.0001$ compare siCtl+GFP à siBAG3#5+GFP ; ns, $p = 0,0540$ compare siCtl+GFP et siBAG3#5+S385A-S386A.

Suivant ce protocole, la déplétion de BAG3 a conduit à une diminution notable du nombre de MIBS par cellule (~63 (+/- 4,4)) comparé aux cellules contrôles (~142 (+/- 5,4), fig. 3.6). L'expression de BAG3-GFP_S385A-S386A n'a pas amélioré le nombre de MIBS suivant la déplétion de BAG3 (~83 (+/- 6,7)) contrairement à l'expression de BAG3-GFP_WT (~112 (+/- 7)), fig. 3.6). Ces résultats suggèrent donc que la phosphorylation de la S385 et S386 est importante pour l'assemblage moléculaire des MIBS.

Ensemble, ces résultats suggèrent que la phosphorylation mitotique de BAG3 sur les résidus S385 et S386 facilite l'arrondissement cellulaire et assure l'assemblage moléculaire de p62 au sein des MIBS, mais ne semble pas participer au processus guidant l'orientation du fuseau mitotique. Ces résultats suggèrent donc que la phosphorylation des résidus T285 et S386 de BAG3 pourrait moduler de façon différentielle les fonctions mitotiques de BAG3 (puisque la phosphorylation de la T285 semble importante pour l'ensemble des phénotypes étudiés tandis que la S386 ne semble pas être impliquée dans le processus d'orientation du fuseau mitotique) et qu'il pourrait exister un découplage des fonctions mitotiques de BAG3 de manière dépendante de la phosphorylation sur des sites spécifiques.

3.3. Rôle du résidu S195 et de la kinase Aurora A dans la régulation de la localisation de BAG3 en G2/M.

Nous avons démontré que lors de la transition G2/M, BAG3 présente un enrichissement périnucléaire/centrosomal qui est régulé par son association à HSPB8 (annexe 1, Fuchs et al. 2015, fig. 5F et G). Il est important de noter que la synchronisation des cellules en G2/M est réalisée par une inhibition de l'activité de CDK1, en utilisant le RO3306. Ainsi, observer un enrichissement périnucléaire de BAG3 par cette méthode suggère que celui-ci est indépendant de l'activité de CDK1. En outre, aucun retard de migration sur gel de BAG3 est détecté dans les extraits cellulaires arrêtés en G2/M par traitement au RO3306, ni aucun signal phospho-BAG3 sur les résidus ciblés par CDK1 (T285, S386) (Fuchs et al, 2015, annexe 1 fig. 5D ; chapitre 2, fig. 2.1E et fig. 3.4B). Ce résultat corrobore le fait que ces résidus sont phosphorylés par CDK1 lors de l'entrée des cellules en mitose. Il apparaît donc peu probable que ces résidus soient impliqués dans la régulation de l'enrichissement périnucléaire de BAG3 en G2/M.

Cependant, une étude de phosphoprotéomique quantitative analysant la phosphorylation des protéines en mitose a permis d'identifier un résidu (Olsen et al. 2010), non couvert par nos analyses, et qui se révèle très intéressant : il s'agit de la S195, située 13 acides aminés en amont du second motif IPV de BAG3 (fig. 3.7A) qui régule son association avec HSPB8, laquelle contrôle l'enrichissement périnucléaire de BAG3 (Fuchs et al, 2015, annexe 1, fig. 5F et G, chapitre 3, fig. 3.7). De plus, une analyse de la séquence de BAG3 via *ScanSite* a permis de montrer que la S195 est située dans un site consensus potentiel pour la kinase Aurora A (fig. 3.7A), dont le pic d'activité a lieu à la transition G2/M. L'activité de Aurora A joue un rôle crucial pour la maturation et la séparation des centrosomes, l'entrée des cellules en mitose via l'activation de CDK1, ou encore la formation et la fonction du fuseau mitotique (Seki et al. 2008; Horn et al. 2010; Nikonova et al. 2013). De surcroît, l'inhibition d'Aurora A a un effet partiel sur la phosphorylation de BAG3 (chapitre 2 et fig. 3.4).

Ainsi, nous avons voulu 1) vérifier l'implication de la phosphorylation des résidus S284 et T285 ou S385 et S386 dans la régulation de la localisation de BAG3 en G2/M ; et 2) tester l'impact de la mutation de la S195 en alanine non phosphorylable ainsi que de l'activité de la kinase Aurora A sur l'enrichissement périnucléaire de BAG3 dans des cellules en G2/M. Pour ce faire, des cellules HeLa-RFP-H2B déplétées en BAG3 endogène exprimant les protéines BAG3-GFP_WT, S195A, IPV, S284A-T285A et S385A-S385A ont été arrêtées en G2/M par traitement au RO3306 et traitées

ou non avec un inhibiteur d'Aurora A (MLN8437, fig. 3.7B et C). La localisation des protéines BAG3-GFP WT ou mutantes a ensuite été analysée par immunofluorescence.

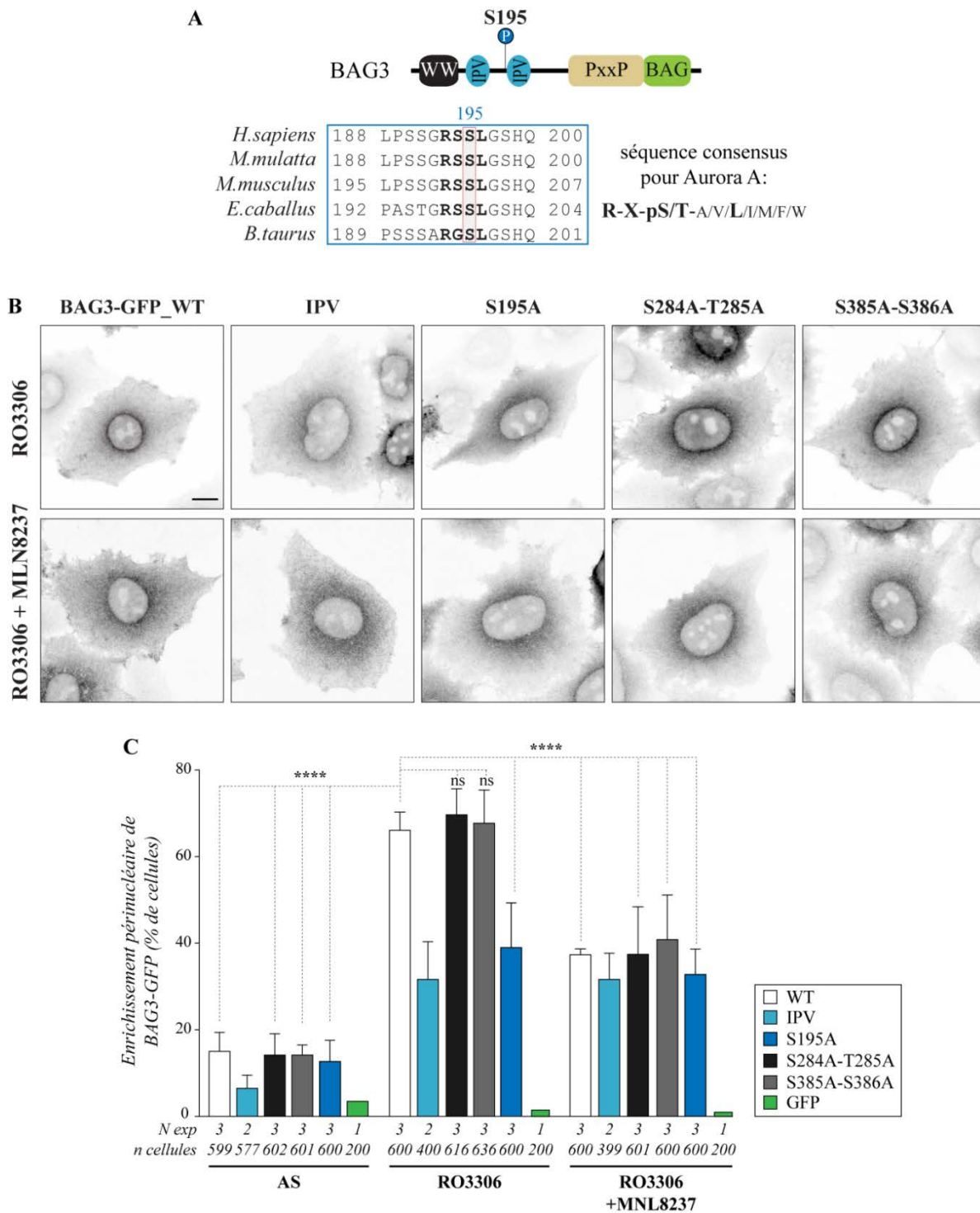


Figure 3.7 : La mutation de la S195 de BAG3 en alanine non phosphorylable et l'inhibition de l'activité d'Aurora A diminuent l'enrichissement périnucléaire de BAG3 en G2/M. (A) Schéma représentant la structure de BAG3 avec ses différents domaines d'interaction protéine-protéine. Alignement de séquences de

la région périphérique à la sérine 195 chez plusieurs espèces de mammifères montrant la conservation du résidu S195 dans l'évolution et la présence de S195 dans une séquence consensus pour Aurora A. **(B)** Images confocales montrant la localisation de BAG3-GFP_WT ou mutants (IPV, S284A-T285A, S385A-S386A et S195A) dans des cellules HeLa-RFP-H2B arrêtées à la transition G2/M (RO3306) et traitées avec un inhibiteur de la kinase Aurora A (MLN8237). Les cellules ont été infectées avec des adénovirus recombinants conduisant l'expression des protéines GFP ou BAG3-GFP suivant la déplétion sur 42 h de BAG3 avec un siARN spécifique ciblant la région 3'UTR (siBAG3#3) puis ont été synchronisées en G2/M avec du RO3306 (8 μ M, 18 h) et traitées ou non avec du MLN8237 (0,5 μ M, 18 h). Les immunofluorescences de BAG3 ont été effectuées avec un anti-GFP; Barre, 10 μ m. **(C)** Histogramme montrant le pourcentage de cellules avec un enrichissement périnucléaire de BAG3-GFP provenant des quantifications réalisées à partir des IF en **(C)**. Moyennes \pm SEM représentatives de 1 à 3 expériences indépendantes où 200 à 636 cellules par condition ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher et ****, $p < 0,0001$; n.s., $p = 0,4641$ compare la condition BAG3-GFP_WT RO3306 à la condition BAG3-GFP_S284A-T285A RO3306 et n.s., $p = 0,4381$, compare la condition BAG3-GFP_WT RO3306 à BAG3-GFP_S385A-S386A RO3306.

Nous avons observé que BAG3-GFP_WT est enrichie à la région périnucléaire dans les cellules traitées au RO3306 ($\sim 66\%$ ($\pm 4,2\%$), fig. 3.7B et C) comparé à la protéine GFP seule (1,5%, fig. 3.7C) ou aux cellules asynchrones ($\sim 15\%$ ($\pm 4,4\%$), fig. 3.7C). À l'inverse, la localisation du mutant IPV est plus diffuse dans le cytoplasme dans $\sim 32\%$ ($\pm 8,7\%$) des cellules arrêtées en G2/M (fig. 3.7B et C), corroborant les résultats obtenus dans notre étude précédente et suggérant que la liaison de BAG3 à HSPB8 est requise pour favoriser son enrichissement périnucléaire (Fuchs et al. 2015, annexe 1, fig. 5F et G).

Nous avons ensuite observé que les mutants non phosphorylables S284A-T285A et S385A-S386A présentent respectivement un enrichissement périnucléaire dans $\sim 70\%$ ($\pm 6\%$) et $\sim 68\%$ ($\pm 7,6\%$) des cellules en G2/M, respectivement, (fig. 3.7B et C). Ce résultat indique que la phosphorylation de ces résidus n'a pas d'influence sur l'enrichissement périnucléaire de BAG3, et corrèle avec l'observation que nous ne détectons pas de signal de phosphorylation sur ces derniers à la transition G2/M (G2/M, chapitre 2, fig. 2.1E et 3.4B). Ensemble, ces résultats suggèrent donc que l'enrichissement périnucléaire de BAG3 ne dépend pas de l'activité de CDK1, ni de la phosphorylation sur les sites T285 et S386 de BAG3.

Remarquablement, la mutation de la S195 en alanine a eu pour effet de disperser le signal BAG3-GFP dans les cellules en G2/M de façon similaire au mutant IPV; nous avons observé $\sim 39\%$ $\pm 10,6\%$ et $\sim 32\%$ $\pm 8,7\%$ des cellules avec un signal périnucléaire enrichi pour les conditions S195A et IPV respectivement (fig. 3.7B et C). Cette observation suggère que l'enrichissement de BAG3 dans la région périnucléaire pourrait dépendre de la phosphorylation du résidu S195 puisque presque 2 fois moins de cellules présentent un enrichissement périnucléaire par rapport à la protéine sauvage ($\sim 66\%$ ($\pm 4,2\%$), fig. 3.7C). Ce résultat suggère aussi que BAG3 pourrait être phosphorylée sur des sites spécifiques en phase G2/M, dont la S195.

Par ailleurs, l'inhibition d'Aurora A a mimé l'effet du mutant IPV dans les cellules en phase G2/M, c'est-à-dire que nous avons observé une diminution significative (environ 2 fois) du pourcentage de cellules présentant un enrichissement périnucléaire pour toutes les protéines BAG3-GFP exprimées. En effet, alors que l'enrichissement périnucléaire de BAG3-GFP_WT a été observé dans presque 70% des cellules en G2/M non traitées, seulement 35% des cellules (en moyenne) ont arboré cette localisation dans les cellules en G2/M traitées avec l'inhibiteur d'Aurora A (BAG3-GFP_WT : 37,3% (+/- 1,4%), IPV : 31,6% (+/- 6%), S195A : 32,8% (+/- 5.9%), S284A-T285A : 37,4% (+/- 11%) et S385A-S386A : 40,8% (+/- 10,3%) ; fig. 3.7B et C). Ce résultat suggère que l'activité de la kinase Aurora A module l'enrichissement périnucléaire de BAG3. De façon importante, la mutation de la S195 en alanine non phosphorylable mime l'inhibition d'Aurora A et ce résidu se situe dans un site consensus pour cette kinase. Ainsi, nos résultats suggèrent qu'en G2/M la S195 pourrait être potentiellement phosphorylée et que cette phosphorylation pourrait dépendre de l'activité de la kinase Aurora A.

Nous avons généré un anticorps dirigé contre la S195 phosphorylée, cependant les premiers tests réalisés ont démontré qu'il sera nécessaire de le purifier avant de l'utiliser pour des expériences. Pour la suite de l'étude, il sera donc essentiel d'optimiser son utilisation. Avec cet outil, il serait intéressant de 1) vérifier que ce résidu est en effet phosphorylé dans des extraits cellulaires arrêtés à la phase G2/M; 2) comparer l'état de phosphorylation de ce résidu dans des extraits cellulaires asynchrones, en G2/M ou en mitose puisque cette phosphorylation, si elle a lieu en G2/M, pourrait persister en mitose; 3) examiner si l'inhibition d'Aurora A et sa déplétion influencent la phosphorylation de la S195 dans des cellules arrêtées en G2/M. Si ces résultats se révélaient concluant, des essais kinases *in vitro* seraient à réaliser pour confirmer qu'Aurora A phosphoryle directement le résidu S195 de BAG3. Ces expériences permettraient d'identifier un événement de phosphorylation sur BAG3 pendant la phase G2/M sur un site spécifique ainsi que la kinase impliquée.

Aussi, dans le but de confirmer que le résidu S195 est important pour l'enrichissement périnucléaire de BAG3, des expériences de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) pourraient être réalisées. Des expériences de fractionnement cellulaire permettant l'isolation des centrosomes ont montré que BAG3 est enrichie dans la fraction centrosomale pendant la mitose (Fuchs et al, 2015 ; annexe 1, figure 1H). Nous pourrions donc réaliser ces mêmes expériences et comparer les niveaux de BAG3-GFP_WT versus S195A dans les fractions centrosomales à partir d'extraits cellulaires asynchrones, arrêtés en G2/M ou mitotiques. Ces expériences pourraient

démontrer que la phosphorylation de BAG3 sur la S195 serait initiatrice de son recrutement aux centrosomes.

L'ensemble de ces résultats permettraient de mettre en évidence que BAG3 serait phosphorylée sur la S195 par Aurora A afin d'être recrutée à la région périnucléaire. Néanmoins, une grande question émane de ces observations, et sera discutée dans le chapitre 6 : quelle pourrait être la fonction de BAG3, et potentiellement la phosphorylation sur la S195, pendant la phase G2/M ?

3.4. BAG3 s'associe avec des partenaires protéiques différents en G2/M et pendant la mitose.

Les résultats obtenus jusqu'ici suggèrent que BAG3 pourrait être phosphorylée sur des sites différents en G2/M et pendant la mitose (chapitres 2 et 3). En outre, il est bien connu que les événements de phosphorylation permettent de moduler les interactions protéiques assurant ainsi la dynamique des réseaux de signalisation en réponse à un stimulus (Tyanova et al. 2013). En corrélation avec cette idée, nous avons montré que BAG3 interagit plus fortement avec p62 et HDAC6 dans des cellules mitotiques, donc lorsque le co-chaperon est hyperphosphorylé (Fuchs et al, 2015, annexe 1, figure 6D). De ce fait, ceci suggère que la phosphorylation mitotique de BAG3 pourrait moduler des interactions avec ses partenaires. Nous avons donc voulu évaluer si BAG3 possède des partenaires différents dans des cellules asynchrones, en G2/M et pendant la mitose. Sur la base de la localisation de BAG3 en G2/M et de son implication dans la régulation des structures mitotiques d'actine pendant la mitose, nous avons évalué son association avec des protéines du centrosome (CEP170) et de l'enveloppe nucléaire (émerine), ainsi qu'avec des protéines du cytosquelette d'actine (actine, myosine II, filamine A et α -actinine), par co-immunoprécipitation, à partir d'extraits de cellules HeLa asynchrones (AS), arrêtées en G2/M ou synchronisées en mitose (résultats H. Lambert, fig. 3.8A) ou à partir d'extraits de cellules HeLa-Flp-In-TREx asynchrones (AS) ou synchronisées en mitose par traitement au nocodazole après induction de l'expression de BAG3-GFP_WT à des niveaux proches des niveaux de BAG3 endogène (fig. 3.8B).

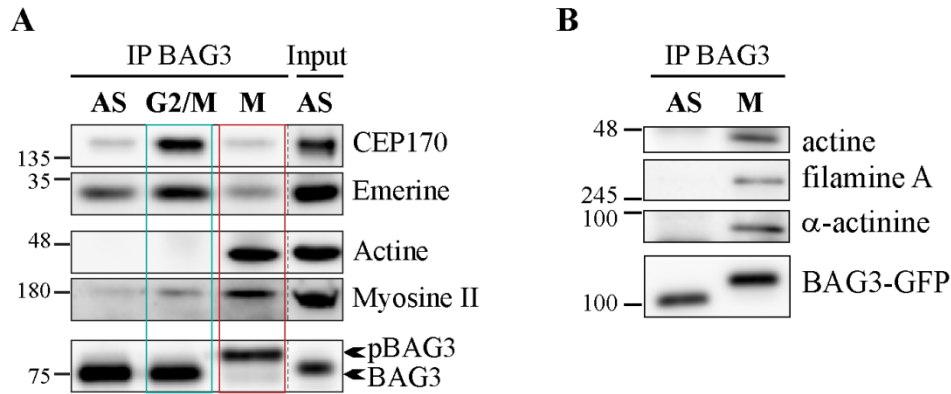


Figure 3.8 : BAG3 possède des partenaires distincts en phase G2/M et pendant la mitose.

(A) WB montrant les IP de BAG3 endogène dans des cellules asynchrones, en G2/M et en mitose. Les IP de BAG3, obtenues en utilisant un anticorps anti-BAG3, ont été réalisées à partir de cellules HeLa synchronisées en G2/M avec du RO3306 (8 μ M, 18 h) ou en mitose avec du nocodazole (400 ng/ml, 16 h) et récupérées par agitation mécanique. Les analyses par WB à partir des extraits cellulaires obtenus ont été réalisées avec les anticorps indiqués. Représentatif de 1 ou 2 expériences. (B) WB montrant les IP de BAG3-GFP_WT dans des cellules asynchrones et mitotiques. Les IP de BAG3 exogène ont été réalisées à partir de cellules HeLa-Flp-in-TREx traitées avec de la doxycycline (10 ng/ml, 4 h) pour induire l'expression de BAG3-GFP_WT, synchronisées en mitose avec du nocodazole (8 h post-induction, 200 ng/ml, 16 h) et récupérées par agitation mécanique. Pour toutes les conditions, les IP ont été réalisées 24 h après l'induction avec des anticorps anti-GFP. Les WB ont été effectués avec des anticorps anti-actine, anti-filamine A, anti- α -actinine et anti-GFP (pour la détection de BAG3). Représentatif de 5 expériences.

CEP170 est une protéine centrosomale et donc localisée dans la région juxta-nucléaire au niveau du MTOC en interphase. De plus, les expériences d'isolation des centrosomes mentionnées précédemment, ont révélé que BAG3 et CEP170 sont toutes deux enrichies dans les fractions centrosomales (Fuchs et al, 2015 ; annexe 1, figure 1H). Pour finir, CEP170 a été retrouvée de façon abondante dans des expériences préliminaires de spectrométrie de masse effectuées pour analyser l'interactome de BAG3 dans des extraits cellulaires asynchrones et mitotiques (H. Lambert, résultats non présentés). Émerine quant à elle, est une protéine de l'enveloppe nucléaire qui participe à l'ancrage de celle-ci au cytosquelette et a également été retrouvée dans l'interactome de BAG3. En premier lieu, nous avons observé que CEP170 et émerine ont co-précipité avec BAG3 dans les cellules asynchrones confirmant une association entre ces protéines et BAG3. Remarquablement, alors que ces interactions semblent inchangées pendant la mitose, une nette augmentation est notée dans les extraits cellulaires en G2/M (fig. 3.8A). Ces résultats suggèrent ainsi l'existence d'une interaction préférentielle de BAG3 avec CEP170 et émerine à la phase G2/M, ce qui corrèle avec l'observation de l'enrichissement centrosomale et périnucléaire de BAG3 à cette phase (annexe 1, Fuchs et al. 2015, fig. 5F et G ; fig. 3.7).

Nous avons montré que BAG3 facilite des processus mitotiques comme l'arrondissement cellulaire et la formation du cortex mitotique qui nécessitent un remodelage drastique des structures à base d'actine (Fuchs et al, 2015, annexe 1 ; chapitre 2 et fig. 3.5). Ces deux processus requièrent l'activité de la protéine motrice myosine II. De plus, actine et myosine II ont été retrouvées dans les expériences préliminaires de l'analyse de l'interactome de BAG3 (résultats non présentés) et myosine II a été identifiée comme un partenaire de BAG3 dans les cellules musculaires squelettiques (Hong et al. 2016). Nous avons donc voulu déterminer si BAG3 pouvait interagir avec actine et/ou myosine II lors de la mitose. De manière importante, nous avons observé qu'actine a co-précipité avec BAG3 dans les extraits cellulaires mitotiques tandis qu'aucun signal n'a été détecté dans les extraits cellulaires asynchrones ou en G2/M (fig. 3.8A). Ceci suggère que l'interaction entre BAG3 et actine a lieu préférentiellement pendant la mitose. Nous avons également observé que myosine II a co-précipité avec BAG3 dès la phase G2/M et que cette interaction est augmentée pendant la mitose (fig. 3.8A). Ce résultat suggère que l'association entre BAG3 et myosine II est stimulée de la transition G2/M à la mitose.

Par ailleurs, dans le contexte des cellules musculaires, des études ont montré que 1) BAG3 co-localise avec l'ABP α -actinine dans le disque Z (Homma et al. 2006; Arndt et al. 2010) ; 2) l'ABP filamine A est un interacteur de BAG3, et d'ailleurs cette protéine est son unique substrat autophagique connu à ce jour (Arndt et al. 2010; Ulbricht et al. 2013; Kathage et al. 2017). Or, un criblage des gènes impliqués dans le processus d'arrondissement cellulaire durant la mitose a révélé que α -actinine est localisée au cortex des cellules pendant la mitose et facilite la localisation de myosine II au cortex conduisant à une augmentation de la tension corticale (Fischer-Friedrich et al. 2016; Toyoda et al. 2017). De plus, α -actinine a été détectée dans les expériences préliminaires de MS dans les extraits cellulaires mitotiques (H. Lambert, résultats non présentés). Par ailleurs, filamine A a été retrouvée enrichie au cortex dans un contexte de cellules méiotiques (Wang et al. 2017) et pendant la mitose, filamine A modulerait le remodelage du cytosquelette d'actine de façon dépendante de sa phosphorylation par CDK1 (Cukier et al, 2007). Nous avons donc voulu évaluer si ces protéines seraient capables d'interagir avec BAG3 dans le contexte de la mitose. Les IP de BAG3-GFP_WT à partir d'extraits cellulaires HeLa-Flp-In-TREx asynchrones ou mitotiques ont révélé que, comme observé dans les IP de BAG3 endogène (fig. 3.8A), actine co-précipite préférentiellement avec BAG3-GFP_WT pendant la mitose par rapport aux cellules asynchrones (fig. 3.8B). Nous avons également observé que α -actinine et filamine A ont co-précipité avec BAG3-GFP_WT dans les extraits cellulaires mitotiques mais pas dans les extraits cellulaires

asynchrones (fig. 3.8B). Ce résultat suggère donc une interaction préférentielle entre BAG3 et α -actinine et filamine A pendant la mitose.

De manière importante, nos résultats sont les premiers, à notre connaissance, à montrer une interaction entre BAG3 et actine et α -actinine, ou encore avec CEP170 et émerine. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que BAG3 interagit préférentiellement avec des protéines localisées aux centrosomes et à l'enveloppe nucléaire en phase G2/M. De ce fait, l'enrichissement périnucléaire de BAG3 en G2/M pourrait potentiellement favoriser ces interactions. D'autre part, nos résultats suggèrent que des associations préférentielles entre actine, les protéines qui organisent l'architecture du cytosquelette d'actine et BAG3 semblent prendre place lorsque BAG3 est hyperphosphorylée pendant la mitose. Ceci suggère également que BAG3 pourrait faciliter le remodelage des structures d'actine mitotiques via son association avec ces protéines.

3.5. Conclusion.

En résumé, nos résultats suggèrent que la localisation de BAG3 en G2/M pourrait dépendre de sa phosphorylation sur S195, potentiellement par la kinase Aurora A, et nous avons montré que sa fonction mitotique dépend de la phosphorylation différentielle sur les résidus T285 et S386. De plus, nos observations suggèrent que BAG3 s'associe distinctement avec des protéines centrosomales et du nucléosquelette en phase G2/M et avec des protéines du cytosquelette d'actine pendant la mitose. L'ensemble de ces observations suggèrent ainsi que BAG3 serait phosphorylée sur des sites différents qui pourraient moduler les interactions observées entre BAG3 et ses partenaires. Pour tester cette hypothèse, il serait nécessaire de 1) déterminer si le mutant BAG3-GFP_S195A ou l'inhibition de la kinase Aurora A dans des cellules en G2/M perturbent les interactions avec CEP170 et émerine ; 2) analyser une potentielle modulation d'interaction entre les mutants de phosphorylation de BAG3, S284A-T285A et S385A-S386A, et les protéines se liant préférentiellement pendant la mitose comme actine, α -actinine et filamine A. Puisque nous avons montré des défauts d'arrondissement des cellules pendant la mitose avec les mutants de phosphorylation de BAG3 (chapitre 2, fig. 2.3), une modulation de l'interaction avec ces protéines pourrait constituer une piste importante vers la compréhension des mécanismes moléculaires régulés par BAG3 pendant la mitose.

Afin d'élucider le mécanisme sous-jacent de la différence de phénotypes sur le positionnement du fuseau mitotique entre les mutants de phosphorylation S284A-T285A et S385A-S386A, il serait

intéressant d'examiner les interactions protéiques de ces derniers avec des protéines qui ont une fonction connue dans ce processus. Par exemple dynéine semble être un très bon candidat puisque cette protéine est un partenaire connu de BAG3 (Gamerding et al. 2011; Xu et al. 2013) qui a une fonction bien établie dans le contrôle du positionnement du fuseau mitotique (Kotak, Busso, et Gönczy 2012b; Tame et al. 2014; Kotak et Gönczy 2014). Des expériences d'immunoprécipitation des mutants non phosphorylables de BAG3 dans des extraits cellulaires mitotiques pourraient être réalisées et l'association à la dynéine serait à analyser.

Les résultats fournis dans ce chapitre, et dans le chapitre 2, mettent donc en lumière que la phosphorylation de BAG3 semble être un élément clé de la modulation de son activité. De plus, ce mécanisme de régulation du co-chaperon se produit sur des sites distincts selon la phase du cycle et lui confère une action cellulaire différente. De ce fait, cela suggère un mode de régulation complexe de BAG3 par sa phosphorylation requise pour l'accomplissement de ses fonctions.

Chapitre 4: Identification de HDAC6 comme une cible du complexe BAG3-HSPB8 dans le remodelage des structures mitotiques à base d'actine.

4.1. Avant propos

Les travaux présentés ci-après sont le fruit d'une collaboration avec ma collègue Dre Alice-Anaïs Varlet (ancienne étudiante au doctorat sous la direction du Dre Josée N. Lavoie). Ces travaux feront l'objet d'une publication en cours de préparation où nous serons co-premières auteures. De manière plus spécifique, les données présentées dans les figures, 4.9, 4.10, 4.11, S4.1 et S4.2 ont été obtenus par cette collaboration. Les résultats présentés dans les figures 4.2 et 4.3 ont été obtenues par Herman Lambert et ceux présentés dans la figure 4.4 par Alice-Anaïs Varlet. J'ai réalisé les expériences présentées dans les figures 4.1, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 et S4.3. Il est à noter que j'ai conçu ce chapitre de façon originale pour sa présentation dans la thèse.

Dans un premier temps, seront présentées des expériences qui ont permis l'analyse fonctionnelle et biochimique de l'interaction entre BAG3 et HDAC6 pendant les phases G2/M et mitotique (fig. 4.1 et 4.2). Dans un second temps, nous analyserons par des expériences biochimiques la dynamique de l'acétylation de cortactine (fig. 4.3) et nous étudierons l'interaction HDAC6-cortactine dans des cellules mitotiques suivant la déplétion de BAG3 et HSPB8 par la méthode de ligation de proximité (PLA ; fig. 4.4). Par la suite, la contribution de BAG3, HSPB8 et p62 ou de l'activité d'HDAC6 et d'Arp2/3 dans la modulation de structures mitotiques à base d'actine, en l'occurrence le nuage sous-cortical d'actine et l'arrondissement mitotique, sera analysée par des expériences de microscopie en cellules vivantes et en immunofluorescences (fig. 4.5 à 4.9). Enfin, des expériences de déplétion-restauration de phénotypes détermineront l'importance fonctionnelle de l'acétylation de cortactine dans le processus d'arrondissement des cellules mitotiques suivant la déplétion de BAG3 ou HSPB8 (fig. 4.10).

4.2. Introduction

Les résultats du laboratoire ont mis en évidence que BAG3 faciliterait le remodelage des structures d'actine qui guident le processus d'arrondissement mitotique et le positionnement du fuseau mitotique, incluant le cortex d'actomyosine et les fibres de rétraction (Fuchs et al, 2015 ; annexe 1, fig. 7A et B; chapitre 2, fig. 3). Nous avons également rapporté que BAG3 est associée plus fortement à p62 et à la déacétylase HDAC6 dans les cellules mitotiques, suggérant un rôle potentiel pour ces protéines dans les fonctions mitotiques de BAG3 (Fuchs et al. 2015, annexe 1, fig. 6D ; chapitre 2, fig. 2.4A). En outre, la déplétion de p62 réplique les phénotypes mitotiques associés à la

déplétion de BAG3 ou de HSPB8. Cependant, la contribution de HDAC6, une déacétylase ayant plusieurs substrats parmi les protéines du cytosquelette, reste à déterminer.

HDAC6 régule l'acétylation de protéines du cytosquelette telles que l'ABP cortactine, myosine II et α -tubuline et cette activité a été impliquée dans le contrôle de la migration cellulaire et l'EMT (Tran et al. 2007; Zhang et al. 2007; Shan et al. 2008; Kaluza et al. 2011; Ran et al. 2015; Zhang et al. 2015). En outre, l'association de p62 à HDAC6 régulerait négativement l'activité catalytique de la déacétylase sur cortactine lors du processus d'assemblage de F-actine entourant l'agrésome (Yan et al. 2013). Or, pour rappel, cortactine déacétylée, en s'associant avec l'actine, recrute le complexe Arp2/3 et stimule la polymérisation de l'actine branchée (Urano et al. 2001; Weaver et al. 2001; Zhang et al. 2007). De façon pertinente, nous avons montré que lors de la cytokinèse, le complexe chaperon BAG3-HSPB8 faciliterait le remodelage de l'anneau contractile qui dirige la séparation des cellules filles en limitant la dynamique de l'actine dépendante d'Arp2/3 (Varlet et al. 2017).

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le complexe chaperon BAG3-HSPB8, via son association à p62, pourrait limiter l'activité d'Arp2/3 en modulant l'activité de HDAC6 sur son substrat cortactine pendant la mitose. Dans ce chapitre seront présentés des résultats visant à analyser la relation fonctionnelle entre BAG3, HSPB8, p62 et HDAC6-cortactine dans la régulation du remodelage de structures mitotiques à base d'actine.

4.3. Analyse de l'interaction fonctionnelle entre BAG3 et HDAC6 pendant les phases G2/M et mitotique.

Nos résultats ont mis en évidence que BAG3 est enrichie dans la région périnucléaire/centrosomale pendant la phase G2/M (chapitre 3, fig. 3.7 ; Fuchs et al. 2015, annexe 1, fig. 5F et G). Par ailleurs, il a été montré que HDAC6 est enrichie à la région périnucléaire dans les cellules asynchrones (Hubbert et al. 2002), mais sa localisation en G2/M n'a pas été étudiée à notre connaissance. Dans l'optique de mieux comprendre la relation fonctionnelle entre BAG3 et HDAC6, nous nous sommes tout d'abord demandés si la localisation de HDAC6 est modulée à la transition G2/M et si oui, déterminer si BAG3 est impliquée dans une telle modulation.

Des immunofluorescences ont donc été réalisées dans des cellules HeLa parentales CCL2 asynchrones ou synchronisées en G2/M avec du RO3306 suivant la déplétion de BAG3 et la localisation de HDAC6 endogène a été analysée.

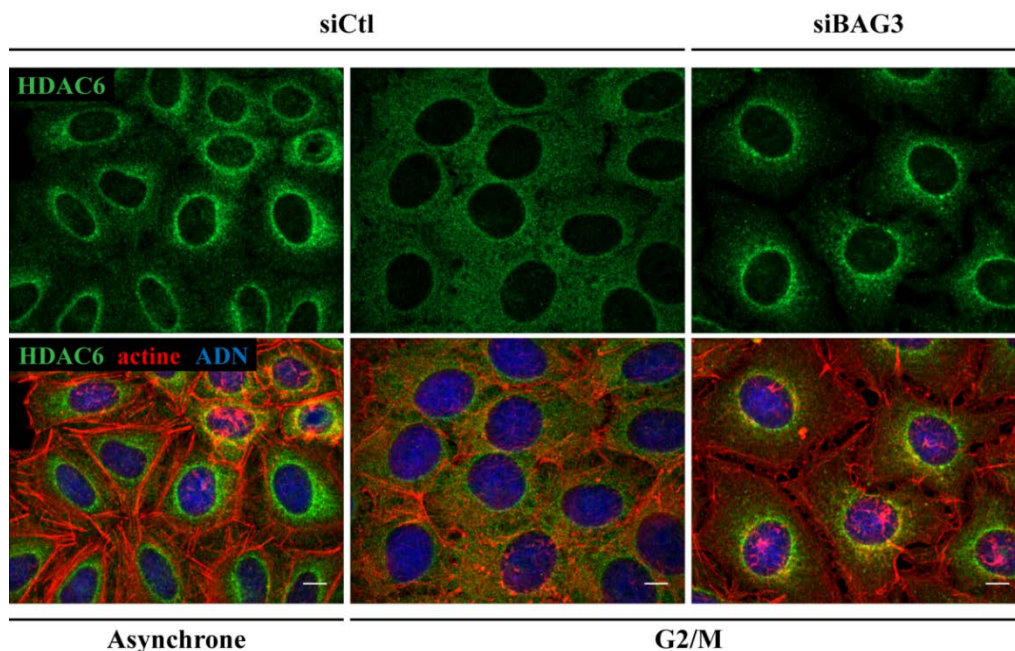


Figure 4.1 : La déplétion de BAG3 interfère avec la relocalisation cytoplasmique de HDAC6 en G2/M. Images confocales montrant la localisation de HDAC6 endogène dans des cellules HeLa parentales CCL2 arrêtées à la transition G2/M (RO3306, 8 μ M, 18h) et transfectées avec un siCtl ou un siBAG3 (siBAG3_1). Les cellules ont été fixées 48h post-transfection (N = 2 expériences). HDAC6 a été marquée avec un anticorps anti-HDAC6, la F-actine a été marquée avec la phalloïdine-Texas-Red et l'ADN avec le Hoechst; barres d'échelle, 10 μ m.

Nous avons noté qu'HDAC6 est enrichie dans la région périnucléaire/centrosomale dans les cellules asynchrones, ce qui est consistant avec la littérature (Hubbert et al. 2002). En revanche, un marquage diffus de HDAC6 a été observé dans le cytoplasme des cellules synchronisées en G2/M (fig. 4.1). Ceci suggère que la localisation de HDAC6 est modulée à la transition G2/M. En contraste, dans les cellules en phase G2/M déplétées en BAG3, HDAC6 a été retrouvée enrichie à la région périnucléaire (fig. 4.1). Ces résultats suggèrent que la déplétion de BAG3 interfère avec la relocalisation de HDAC6 dans les cellules en G2/M et suggèrent une rétention de HDAC6 dans la région périnucléaire des cellules déplétées en BAG3.

Puisque BAG3 module la localisation de HDAC6, nous avons voulu déterminer si l'association entre les protéines était également modulée et analyser les déterminants structuraux de cette interaction. Des immunoprécipitations ont été réalisées à partir d'extraits de cellules HeLa-RFP-H2B asynchrones (AS), arrêtées à la transition G2/M ou synchronisées en mitose, après déplétion de BAG3 endogène et expression de protéines BAG3-GFP_WT ou mutantes (IPV et Δ PxxP). Pour rappel les deux mutants étudiés, portant des mutations sur les motifs IPV qui abolissent la liaison à HSPB8 (BAG3_IPV) ou possédant une délétion du domaine PxxP (Δ PxxP), correspondent à des

mutants pertes de fonction de l'activité mitotique de BAG3 (Fuchs et al, 2015, annexe 1). Nous avons également évalué une interaction potentielle avec un substrat majeur de HDAC6 impliqué dans la modulation du cytosquelette d'actine : cortactine.

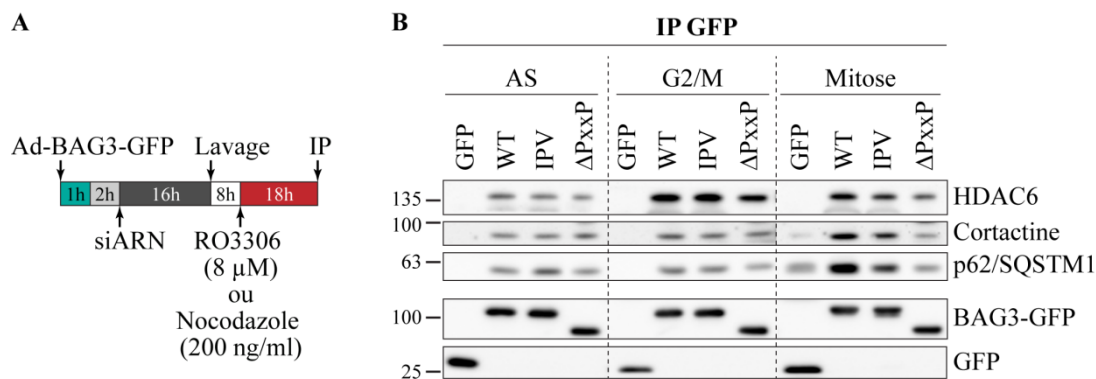


Figure 4.2 : L'association de BAG3 avec ses partenaires p62, HDAC6 et son substrat cortactine est différentielle en phase G2/M et dans les cellules mitotiques.

(A) Schéma du protocole utilisé pour les IP de BAG3-GFP sauvage (WT) ou mutants (IPV et ΔPxxP). Des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en G2/M avec du RO3306 (8 μM, 18h) ou en mitose avec du nocodazole (200 ng/ml, 16h). Les cellules ont été infectées avec des adénovirus recombinants conduisant l'expression de GFP ou des protéines BAG3-GFP suivant la déplétion sur 48 h de BAG3 endogène à l'aide d'un siARN spécifique ciblant la région 3'UTR (siBAG3#3). (B) WB montrant les IP de BAG3-GFP_WT ou mutants IPV et ΔPxxP dans des extraits cellulaires asynchrones (AS), en G2/M ou en mitose suivant le protocole A. Les extraits cellulaires mitotiques ont été préparés à partir des cellules en mitose récupérées par agitation mécanique. Les IP ont été réalisées en utilisant un anticorps anti-GFP. Les analyses en WB à partir des IP obtenues ont été effectuées avec les anticorps indiqués. (NB : Les résultats de cette expérience ont servi également pour l'analyse de l'interaction de BAG3 avec CDK1 et p62 dans les extraits de cellules asynchrones et mitotiques dans la figure 2.4 de cette thèse).

Tout d'abord, nous avons observé que p62, HDAC6 ainsi que cortactine ont co-précipité avec BAG3-GFP_WT dans les cellules asynchrones, arrêtées en G2/M et mitotiques (fig. 4.2B). Néanmoins, l'interaction entre BAG3 et HDAC6 semble plus importante en G2/M comparativement aux cellules asynchrones (fig. 4.2B), ce qui corrèle avec l'effet de BAG3 sur la localisation de HDAC6 (fig. 4.1). En revanche, l'association avec cortactine et p62 demeure inchangée à cette phase par rapport aux cellules asynchrones. De plus, en G2/M, la mutation des motifs IPV et du domaine PxxP n'ont pas d'impact sur l'association avec p62 et cortactine, tandis que la délétion du domaine PxxP semblerait diminuer l'association à HDAC6. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre BAG3 et HDAC6 est stimulée à la transition G2/M, contrairement à l'association à p62 et cortactine, de façon indépendante de la liaison à HSPB8. Ce résultat suggère donc, qu'à cette phase, l'association entre BAG3 et HDAC6 serait indépendante de p62 et cortactine.

Pendant la mitose, l'association entre BAG3 et HDAC6 est réduite comparativement aux cellules en G2/M, bien qu'elle demeure plus substantielle que dans les cellules asynchrones. À l'inverse, nous avons observé que l'interaction de p62, comme montré dans le chapitre 2, et cortactine avec BAG3 est stimulée dans les cellules mitotiques comparativement aux cellules asynchrones ou arrêtées en G2/M. Ce résultat suggère qu'un complexe composé de BAG3-HSPB8-p62-HDAC6 avec la cible de HDAC6 cortactine se formerait pendant la mitose. Durant cette phase, nous avons observé une diminution de l'association entre les mutants IPV et Δ PxxP avec HDAC6 ainsi qu'avec p62 et cortactine dans les extraits cellulaires mitotiques par rapport à l'interaction avec BAG3-GFP_WT (fig. 4.2B). Ces résultats suggèrent que les motifs IPV et le domaine PxxP de BAG3 sont requis pour faciliter les interactions mitotiques avec p62, HDAC6 et cortactine, renforçant l'hypothèse que la formation de ce complexe pourrait être importante pour la fonction mitotique de BAG3. De plus, ces observations suggèrent que pendant la mitose, HSPB8 jouerait un rôle important dans le recrutement de p62 et cortactine.

L'ensemble de ces observations nous permettent donc de spéculer qu'à la phase G2/M l'association BAG3-HDAC6 serait stimulée et contribuerait au changement de localisation de HDAC6, puis lors de la mitose, HSPB8 favoriserait le recrutement du substrat de HDAC6, cortactine, ainsi que de son régulateur négatif, p62. L'augmentation d'interaction de BAG3 à HDAC6 en G2/M, sans augmentation d'interaction avec sa cible cortactine ou p62, tandis qu'est observée une diminution de l'association BAG3-HDAC6 en mitose avec une augmentation de la liaison à p62 et cortactine, suggèrent des liens fonctionnels complexes et potentiellement différents entre ces protéines en G2/M et pendant la mitose.

Notamment, le rôle de l'exclusion de HDAC6 de la région périnucléaire/centrosomale en phase G2/M reste à élucider. Il a été montré que la phosphorylation de HDAC6 par Aurora A stimule son activité déacétylase (Pugacheva et al. 2007) et de plus, cette kinase est active et enrichie dans la région périnucléaire en G2/M (Hirota et al. 2003; Barretta et al. 2016). Il serait donc envisageable que BAG3 orchestre l'export de HDAC6 de la région périnucléaire/centrosomale pour limiter son activité déacétylase dans cette région. Ceci pourrait être requis du fait qu'à cette phase, s'effectue des étapes cruciales pour la maturation et la séparation des centrosomes nécessitant une dynamique des microtubules (Carmena, Ruchaud, et Earnshaw 2009; Nikonova et al. 2013). Or, l'acétylation d' α -tubuline est connue pour stabiliser les microtubules (Shi et al. 2015; Wang et al. 2016; Janke et Montagnac 2017). De ce fait, limiter l'activité déacétylase de HDAC6 dans la région centrosomale pourrait assurer une balance acétylation/déacétylation de tubuline et donc permettre une dynamique

des microtubules adéquate. Néanmoins, bien que séduisante, cette hypothèse semble peu probable au vu des résultats obtenus au laboratoire. En effet, les analyses réalisées jusqu'à présent n'ont pas révélé d'effet probant de BAG3 sur la dynamique des microtubules pendant la mitose. Une autre hypothèse nous est donc apparue plus plausible : HDAC6 pourrait être importée dans le cytoplasme pour orchestrer le remodelage du cytosquelette d'actine via sa cible : l'ABP cortactine. Les prochaines expériences présentées dans ce chapitre viseront à élucider le lien entre BAG3-HSPB8, l'activité de HDAC6 et la dynamique d'acétylation de la cortactine sur la modulation des structures mitotiques à base d'actine.

4.4. L'acétylation de cortactine est augmentée dans les cellules mitotiques et son association à HDAC6 est régulée à la baisse par le complexe BAG3-HSPB8.

À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la régulation de l'activité de HDAC6 à proprement parler pendant la mitose ni son impact sur le remodelage des structures mitotiques d'actine. Puisque nous avons montré une association mitotique entre BAG3, p62, HDAC6 et cortactine qui dépend de l'interaction de BAG3 à HSPB8, nous avons voulu déterminer si BAG3 et HSPB8 modulent l'activité de HDAC6 pendant la mitose.

Dans un premier temps, la dynamique de l'acétylation des substrats de HDAC6 et spécifiquement de cortactine, a été étudiée dans des cellules asynchrones et mitotiques. Pour ce faire, des cellules HeLa ont été synchronisées en mitose en présence d'un inhibiteur sélectif de HDAC6 la tubacine, pour 4 et 8h, afin d'analyser les taux de déacétylation dépendants de l'activité de HDAC6 (Haggarty et al. 2003; Schölz et al. 2015). L'analyse des niveaux totaux d'acétylation des protéines a été effectuée par WB (fig. 4.3, Ac-K) ainsi que les niveaux d'acétylation de cortactine sur le résidu K309, qui est un résidu ciblé par HDAC6 (Zhang et al. 2007; fig. 4.3, Ac-K309).

Une augmentation notable de l'acétylation des protéines totales ainsi que de cortactine sur le résidu K309 a été observée dans les cellules asynchrones suivant l'inhibition de HDAC6 (fig. 4.3). Ceci indique que HDAC6 est active dans les cellules asynchrones et que son inhibition influence la dynamique d'acétylation/déacétylation des protéines, y compris celle de cortactine. Dans les cellules mitotiques, le niveau basal d'acétylation de cortactine sur le résidu K309 semble être augmenté, c'est-à-dire dans la condition sans traitement par rapport aux cellules asynchrones non traitées (fig. 4.3, Ac-K309), et une augmentation claire de l'acétylation totale des protéines a été observée dans ces mêmes conditions (fig. 4.3, Ac-K). Ce résultat suggère une augmentation de

l'activité d'acétyl-transférases ou une réduction de l'activité de déacétylases ciblant cortactine pendant la mitose. Il est à noter que l'acétylation de cortactine diminue sa liaison à la F-actine, résultant en une diminution du recrutement et de l'activation du complexe Arp2/3 ce qui par conséquent, inhibe la formation du réseau d'actine branchée (Zhang et al. 2007; Uruno et al. 2001; Weaver et al. 2001). Or, il a été montré que l'entrée des cellules en mitose est accompagnée d'une permutation de l'activité d'Arp2/3 en faveur de mDia, suggérant une diminution globale de l'activité d'Arp2/3 (Rosa et al. 2015). Ainsi, une augmentation de l'acétylation de cortactine pendant la mitose est corrélée avec une diminution de l'activité d'Arp2/3 pendant la mitose.

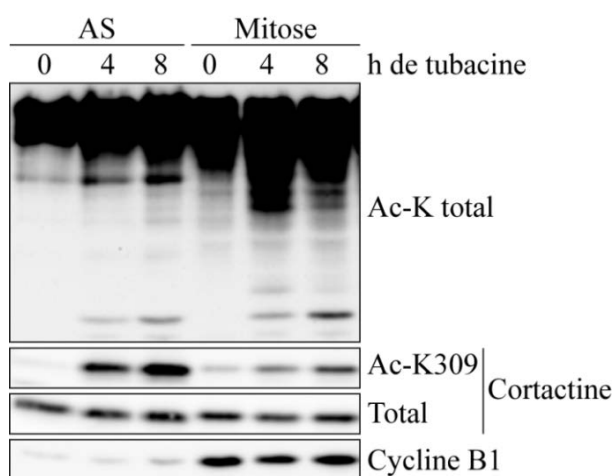


Figure 4.3 : L'acétylation des protéines est augmentée pendant la mitose par rapport aux cellules asynchrones et l'inhibition de HDAC6 a un effet moindre dans les cellules mitotiques sur l'acétylation de cortactine.

WB montrant le niveau d'acétylation totale des protéines ou de l'acétylation de cortactine sur K309 en réponse à l'inhibition de HDAC6, par traitement avec un inhibiteur spécifique la tubacine, dans des cellules asynchrones et mitotiques. Des cellules HeLa-RFP-H2B asynchrones et synchronisées en mitose avec la méthode du double blocage à la thymidine (2 mM, 16h) ont été traitées pendant 0, 4 ou 8 h avec de la tubacine (5 μ M) puis extraites pour l'analyse en WB. Les cellules mitotiques ont été récupérées par agitation mécanique. Les WB ont été réalisés en utilisant un anticorps anti-acétylation totale (Ac-K), un anti-acétyl-cortactine (Ac-K309); niveaux de cycline B1: contrôle de synchronisation mitotique; cortactine totale: contrôle de dépôt.

Bien qu'une augmentation de l'acétylation sur K309 de cortactine pendant la mitose ait été observée après traitement à la tubacine, celle-ci serait substantiellement moins importante que dans les cellules asynchrones (fig. 4.3, Ac-K309). Puisque l'inhibition de HDAC6 ne provoque pas une forte augmentation de l'acétylation de cortactine, ceci suggère que l'activité de HDAC6 sur cortactine serait diminuée dans les cellules mitotiques. Par conséquent, l'association de cortactine à la F-actine serait limitée et aboutirait à une diminution de l'activité d'Arp2/3 pendant la mitose.

Puisque l'acétylation sur le résidu K309 de cortactine semble être augmentée et que nos résultats suggèrent une diminution de l'activité de HDAC6 sur cortactine pendant la mitose (fig. 4.3), nous avons voulu évaluer si l'interaction entre HDAC6 et cortactine pourrait être limitée dans les cellules

mitotiques. Pour explorer cette hypothèse, la technique de « *Proximity Ligation Assay* », ou PLA, a été utilisée puisqu'elle permet de détecter et de quantifier *in situ* les interactions protéine-protéine, à un niveau moléculaire (Söderberg et al. 2006; Gullberg et Andersson 2010). Brièvement, le PLA est une variante de l'immunofluorescence où les protéines d'intérêts, ici HDAC6 et cortactine, sont reconnues par des anticorps primaires spécifiques. La particularité est que si les anticorps secondaires, conjugués à une courte séquence d'oligonucléotides complémentaires l'un de l'autre, sont à proximité de moins de 40 nm, s'en suit une série d'amplification des séquences nucléotidiques qui résultent en la formation d'un point ou « spot » fluorescent distinct (cf. fig.4.4 pour le détail de la méthode). Celui-ci reflète une proximité entre les deux molécules suggérant une interaction entre les protéines d'intérêt. Le nombre de spots détectés en microscopie à fluorescence peut être ainsi quantifié et représente le nombre d'interactions moléculaires entre les deux protéines. Utilisant cette technique, l'interaction de HDAC6 avec cortactine dans des cellules HeLa parentales CCL2 asynchrones ou mitotiques exprimant GFP-HDAC6 et myc-cortactine a été analysée (fig. 4.4).

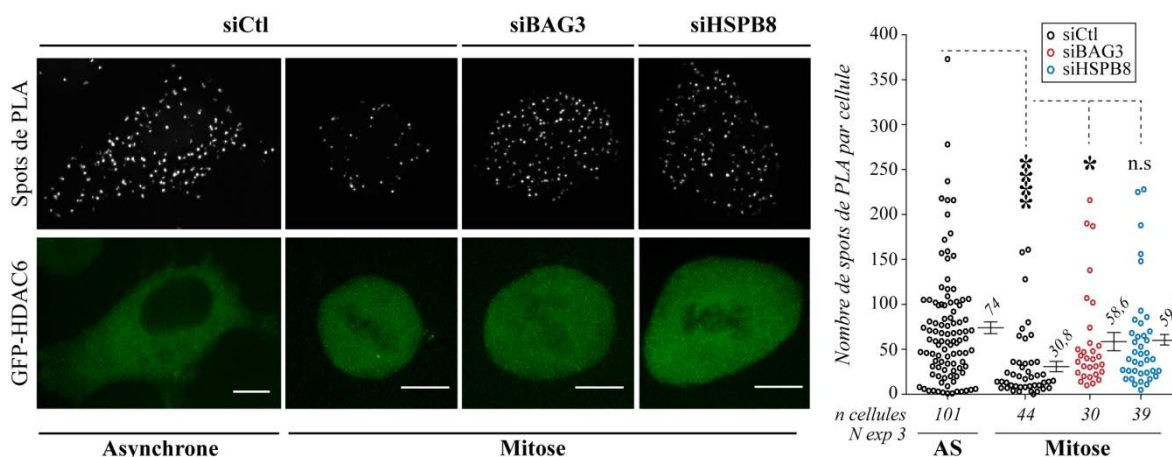


Figure 4.4 : Le complexe BAG3-HSPB8 contribue à diminuer l'interaction HDAC6-cortactine pendant la mitose. Images confocales montrant des spots d'interaction entre HDAC6 et cortactine par « *Proximity Ligation Assay* » (PLA) dans des cellules HeLa parentales CCL2 asynchrones (AS) ou mitotiques contrôles ou suivant la déplétion de BAG3 ou HSPB8. Des cellules HeLa parentales CCL2 ont été synchronisées en mitose par double blocage à la thymidine (2 mM, 16h), transfectées avec des siARN spécifiques (siBAG3#1 et siHSPB8#2) pendant 48 h et avec les vecteurs GFP-HDAC6 et myc-cortactine durant 24 h ; barres, 10 µm. Après fixation, la méthode d'immunofluorescence dérivée PLA a été appliquée sur les cellules. HDAC6 et cortactine exogènes ont été ciblées par des anticorps primaires spécifiques conventionnels. Dans la technique du PLA, les anticorps secondaires nommés sondes PLA, sont conjugués à une courte séquence d'oligonucléotides complémentaires l'un de l'autre. Lorsque ces sondes sont à proximité de moins de 40 nm, l'addition d'oligonucléotides dit de connexion, s'hybrident avec les sondes PLA et sont ligaturés par une ligase afin de former une matrice d'ADN circulaire qui est ancrée aux anticorps. L'ajout subséquent d'une polymérase conduit à l'amplification de cette matrice, qui est détectée par des sondes oligonucléotidiques complémentaires marquées par fluorescence. En résulte ainsi la détection d'un point ou « spot » fluorescent

distinct, visualisés en utilisant un microscope à fluorescence standard, et qui est donc dérivé d'événement d'interaction unique de protéine (Söderberg et al. 2006; Gullberg et Andersson 2010). Le graphique représente le nombre de spots de PLA quantifié par cellule ; moyennes +/- SEM représentatives de 3 expériences indépendantes où 30 à 101 cellules individuelles ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test de Dunn suivant le test de Kruskal Wallis ; ****, $p < 0,0001$ compare la condition siCtl asynchrone à celle siCtl mitose ; * $p = 0,0425$ compare siCtl asynchrone et siBAG3 mitose ; n.s, $p > 0,9999$ compare siCtl asynchrone à siBAG3 mitose.

Dans les cellules contrôles asynchrones, nous avons quantifié une moyenne de ~74 spots de PLA HDAC6-cortactine (fig. 4.4). Remarquablement, une diminution significative de 2,4 fois du nombre de spots a été observée dans les cellules mitotiques comparé aux cellules asynchrones (cellules mitotiques : ~31 spots, fig. 4.4). Ce résultat suggère donc que l'interaction entre HDAC6 et cortactine est diminuée pendant la mitose, corrélant avec l'observation de l'augmentation du niveau d'acétylation de cortactine et la diminution de l'activité de HDAC6 sur cortactine pendant la mitose (fig. 4.3).

Puisque BAG3-HSPB8 semble recruter cortactine pendant la mitose, nous avons voulu déterminer si la réduction d'association entre HDAC6 et cortactine pourrait dépendre du complexe chaperon BAG3-HSPB8. Des expériences de PLA ont donc été réalisées dans des cellules mitotiques déplétées en BAG3 ou en HSPB8. De façon importante, le nombre de spots de PLA a presque été doublé dans les cellules mitotiques suivant la déplétion de BAG3 ou HSPB8 (~60 spots) en comparaison aux cellules mitotiques contrôles (~30 spots, fig. 4.4). Ainsi, la déplétion d'une des protéines du complexe chaperon interfère la diminution d'interaction entre HDAC6 et cortactine pendant la mitose. En effet, le nombre de spots de PLA dans les cellules mitotiques déplétées en BAG3 ou HSPB8 (~60 spots) a atteint presque le nombre de spots dans les cellules contrôles asynchrones (~74 spots, fig. 4.4). Ce résultat suggère que la diminution d'association entre HDAC6 et cortactine pendant la mitose est perturbée par la déplétion de BAG3 et de HSPB8.

En résumé, nos résultats suggèrent que HDAC6 est active dans les cellules mitotiques, mais qu'une diminution de son activité a été observée spécifiquement sur cortactine pendant la mitose. Cette observation corrèle avec une diminution significative de l'association HDAC6-cortactine qui serait facilitée par le complexe BAG3-HSPB8. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'activité de HDAC6 sur cortactine pourrait être régulée de façon différentielle par rapport à la globalité des substrats de HDAC6 dans les cellules mitotiques. Ces observations vont dans le même sens qu'une étude qui suggère que BAG3 inhiberait localement l'activité de mTORC1 tandis que son activité globale serait augmentée dans les cellules (Kathage et al. 2017). Dans le but de consolider cette

idée, des expériences pour confirmer que le complexe chaperon module l'activité de HDAC6 sur cortactine pendant la mitose devront être réalisées. Pour cela, les niveaux d'acétylation de cortactine sur le résidu K309 suivant la déplétion de BAG3 ou de HSPB8 pourrait être analysés par des expériences de WB, à partir d'extraits cellulaires mitotiques traités ou non avec la tubacine. Une diminution des niveaux d'acétylation de cortactine en réponse à la déplétion de BAG3 ou de HSPB8 et au traitement avec la tubacine confirmera l'hypothèse.

4.5. Régulation de la polarisation du nuage sous-cortical d'actine par le complexe BAG3-HSPB8-p62 et implication des activités d'Arp2/3 et de HDAC6.

Nous avons apporté des évidences que BAG3-HSPB8 pourrait limiter l'activité du complexe Arp2/3 afin de faciliter le désassemblage de l'anneau contractile qui guide la séparation des cellules filles pendant la cytokinèse (Varlet et al, 2017). Bien que pendant la mitose l'activité d'Arp2/3 serait diminuée (Rosa et al. 2015), la formation d'une structure d'actine hautement dynamique dénommée « nuage sous-cortical d'actine » a été décrite comme dépendante de l'activité du complexe Arp2/3 (Mitsushima et al. 2010; Fink et al. 2011). Ainsi, nous avons raisonné que si le complexe BAG3-HSPB8 module négativement l'activité de HDAC6 sur cortactine, la déplétion de BAG3-HSPB8 pourrait induire une suractivation de HDAC6 sur cortactine. Ceci induirait donc une déacétylation accrue de cortactine et une dérégulation de l'activité Arp2/3 pendant la mitose. Ceci empêcherait alors une régulation fine de l'activité Arp2/3, nécessaire pour contrôler la dynamique du nuage sous-cortical d'actine. Pour tester cette hypothèse, nous avons d'abord vérifié l'impact d'une déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 sur le nuage sous-cortical d'actine.

Pour rappel, le nuage sous-cortical est structure d'actine hautement dynamique, soumise à un renouvellement rapide par polymérisation/dépolymérisation (Mitsushima et al. 2010). Ce mécanisme dirige son mouvement circulaire continu et unidirectionnel, décrit aussi comme polarisé, sous le cortex (de la prométaphase à la métaphase; Mitsushima et al. 2010; Fink et al. 2011). Nous avons donc analysé l'effet de la déplétion de chacune des protéines du complexe BAG3-HSPB8-p62 sur la polarisation du nuage sous-cortical d'actine pendant la mitose. Pour cela, des expériences d'imagerie en temps réel ont été réalisées dans des cellules HeLa-RFP-H2B synchronisées en mitose, déplétées en BAG3, HSPB8 ou p62 et exprimant la sonde LifeAct-GFP, qui permet de visualiser la F-actine en se liant spécifiquement à celle-ci, et α -tubuline-RFP, qui permet d'étudier la dynamique du fuseau mitotique (fig. 4.5).

Dans les cellules contrôles, nous avons observé la présence d'un agglomérat de F-actine situé sous le cortex cellulaire, arborant un mouvement dynamique typique du nuage sous-cortical d'actine, comme décrit dans la littérature (Mitsushima et al. 2010). Nous avons procédé à la quantification de ce phénotype et la présence de la structure sous-corticale dynamique de F-actine a été détectée dans environ 70% des cellules contrôles (catégorie erratique + polarisée, fig.4.5B). Parmi ces 70%, ~50% correspondent à la détection d'un nuage dont la dynamique au cours du temps a suivi un mouvement circulaire, qui peut être parallèle ou perpendiculaire au substrat. Nous avons catégorisé ce type de mouvements comme étant polarisés (fig. 4.5A et B). Il a été reporté que pour la majorité des cellules, une fois que le nuage commence son mouvement, celui-ci ne change pas de direction (Mitsushima et al, 2010). Cependant, cette même étude a montré que 13% des cellules présentent un changement de direction du mouvement du nuage. Et en effet, nous avons constaté que pour environ 18% des cellules, le mouvement du nuage a été anarchique et n'a pas suivi une direction unique (fig. 4.5A et B). Ce phénotype sera référé ci-après comme le mouvement erratique du nuage sous-cortical d'actine. De façon remarquable, nous avons observé une augmentation significative, d'environ 2,5 fois, de la proportion de cellules présentant un mouvement erratique du nuage sous-cortical de F-actine dans les cellules suivant la déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 (~18% dans les cellules contrôles comparé à ~42%, ~52% et ~48% pour les siBAG3, HSPB8 et p62, respectivement, fig. 4.5B). Ces résultats suggèrent que la déplétion de chacune des protéines du complexe BAG3-HSPB8-p62 semble interférer avec la polarisation du mouvement dynamique du nuage sous-cortical de F-actine et provoquerait une dérégulation marquée de cette dynamique d'actine se traduisant par un mouvement anarchique du nuage.

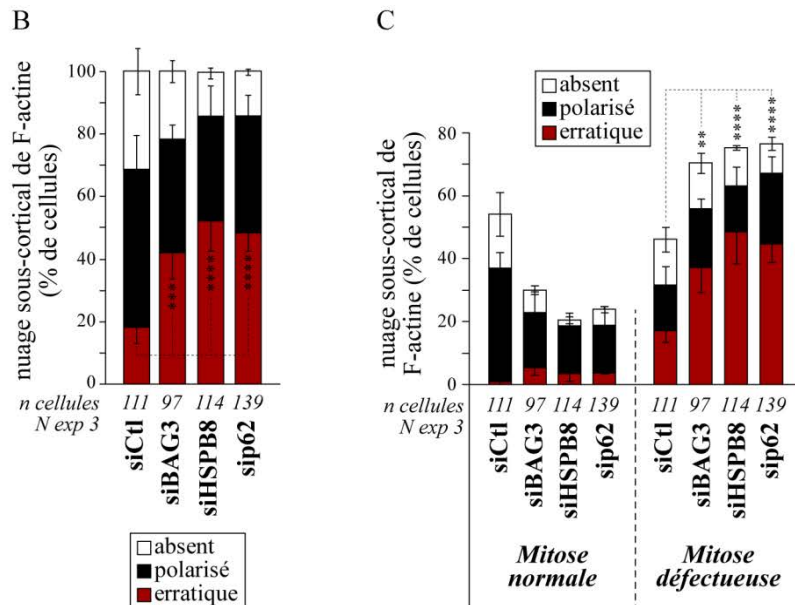
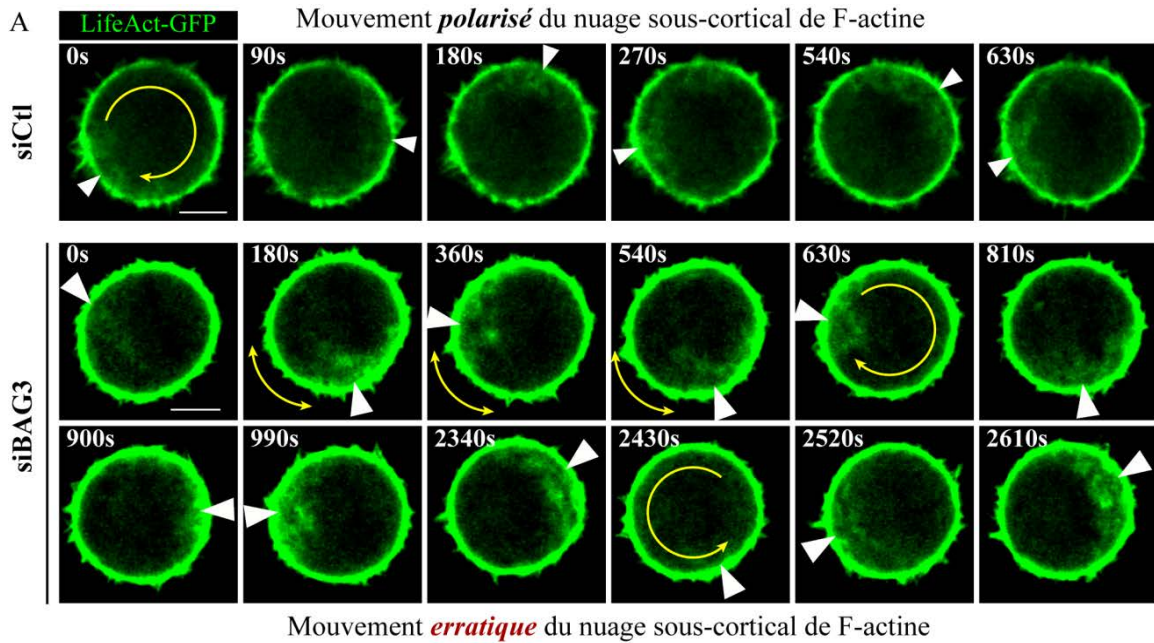


Figure 4.5 : La déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 induit une dérégulation de la dynamique polarisée du nuage sous-cortical d'actine associée à des défauts de positionnement du fuseau mitotique et de la progression mitotique.

(A) Séquences temporelles d'images confocales de cellules mitotiques HeLa-RFP-H2B vivantes et exprimant la sonde LifeAct-GFP, montrant un mouvement polarisé du nuage sous-cortical d'actine dans des cellules contrôles (siCtl, panel du haut) comparé à un mouvement erratique dans des cellules déplétées en BAG3 (siBAG3, panel du bas). Les cellules ont été synchronisées en mitose par la méthode de double blocage à la thymidine (2 mM, 16h), infectées avec l'Ad-LifeAct-GFP (1PFU) et le baculovirus α -tubuline-RFP (4PFU) et transfectées avec différents siARN (siCtl, siBAG3#3, siHSPB8#2 ou sip62#2). Les images ont été acquises en temps réel par microscopie confocale de type « *spinning disc* » durant une période de 75 min à un intervalle de 90 secondes. Les flèches blanches indiquent la position du nuage sous-cortical d'actine et les flèches jaunes sa direction et son mouvement ; barres d'échelle, 10 μ m. (B) Le graphique décrit le pourcentage de cellules, provenant de A, présentant un mouvement polarisé ou erratique du nuage sous-cortical d'actine ou

ne présentant pas de nuage sous-cortical d'actine (absent). Les moyennes +/- SEM sont représentatives de 3 expériences indépendantes où 97 à 139 cellules ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher pour le nuage erratique et ***, $p=0,0002$, compare la condition siCtl à celle siBAG3, ****, $p<0,0001$, compare la condition siCtl aux conditions sip62 et siHSPB8. (C) Graphique montrant le pourcentage de cellules présentant une mitose défectueuse (oscillation du fuseau mitotique et retard de la progression des cellules en prométa- et métaphase). Le protocole décrit en A a été employé pour l'obtention des moyennes +/- SEM représentées provenant de 3 expériences indépendantes où au minimum 93 cellules ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher et **, $p=0,0018$, compare la condition siCtl à celle siBAG3 et ****, $p<0,0001$, compare la condition siCtl à celles siHSPB8 et sip62.

Comme décrit dans la section 1.4.2.2, il a été démontré que les forces émises par les fibres de rétraction influencent la dynamique du nuage sous-cortical d'actine pendant la mitose (Fink et al. 2011). Notamment, le positionnement et l'orientation du fuseau mitotique dépendrait de ces deux structures d'actine hautement dynamiques. Or, nous avons montré que la déplétion des protéines du complexe chaperon BAG3-HSPB8-p62 provoque des défauts de distribution des fibres de rétraction et conduit à des oscillations anormales du fuseau mitotique interférant avec la progression mitotique (Fuchs et al. 2015; annexe 1). Nous avons donc voulu évaluer un lien fonctionnel potentiel entre la dérégulation de la polarisation du nuage sous-cortical d'actine et les défauts de positionnement du fuseau mitotique observés lors de la déplétion des protéines du complexe chaperon.

Nous avons quantifié la proportion de cellules arborant une dynamique erratique du nuage sous-cortical d'actine parmi les cellules mitotiques normales versus défectueuses (oscillations, voire des rotations, du fuseau mitotique et/ou associées à un retard dans la progression mitotique). De façon remarquable, seulement 1% des cellules contrôles complétant une mitose normale ont arboré un nuage erratique, tandis que 36% ont présenté un nuage avec un mouvement polarisé (fig. 4.5C). En revanche, dans les cellules mitotiques contrôles défectueuses, nous avons observé ~17% de cellules arborant un nuage erratique contre ~14% présentant un nuage polarisé (fig. 4.5C). Ce résultat a révélé que la majeure proportion des cellules présentant un nuage avec un mouvement erratique est associée à des défauts d'orientation du fuseau mitotique. Malgré une proportion demeurant faible, la déplétion de BAG3, HSPB8 et p62 a induit une augmentation du pourcentage de cellules mitotiques normales avec un nuage erratique (~5,2% pour la condition siBAG3, ~3,5% pour siHSPB8 et p62 comparé ~1% dans les cellules contrôles, fig. 4.5C). De façon importante, parmi les 70% de cellules mitotiques défectueuses déplétées en BAG3, ~40% d'entre elles ont présenté un nuage sous-cortical avec un mouvement erratique (fig. 4.5C). Parmi les ~80% de cellules mitotiques défectueuses déplétées en HSPB8 ou en p62, ~50% présentent un nuage erratique (fig. 4.5C). Ces observations suggèrent une corrélation entre les défauts de positionnement du fuseau mitotique et la dérégulation de la dynamique polarisée du nuage de F-actine sous-cortical suivant la déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le complexe chaperon faciliterait le

positionnement du fuseau mitotique en partie, en régulant la dynamique d'actine au sein du nuage sous-cortical qui dirige son mouvement polarisé.

Le nuage de F-actine est la seule structure d'actine mitotique connue qui dépend de l'activité du complexe Arp2/3. Nous avons donc voulu déterminer si le complexe chaperon module la dynamique polarisée du nuage d'actine de façon dépendante du complexe Arp2/3. Pour commencer, nous avons testé si l'utilisation d'un inhibiteur spécifique d'Arp2/3, le CK666, induirait le même phénotype que la déplétion d'Arp3 (Nolen et al. 2009). Pour ce faire, des expériences d'imagerie en temps réel dans des cellules HeLa-RFP-H2B synchronisées en mitose et exprimant la sonde LifeAct-GFP et α -tubuline-RFP ont été réalisées. Les cellules ont été traitées avec le CK666 30 minutes avant le début de l'acquisition en temps réel.

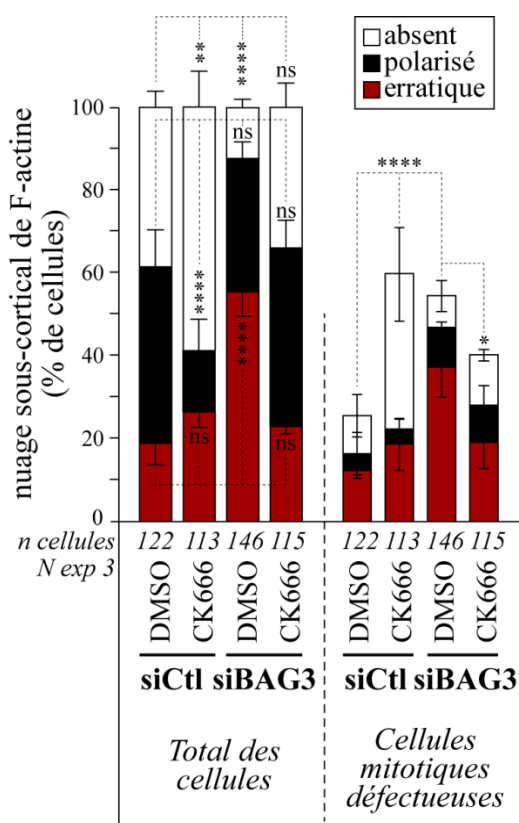


Figure 4.6 : L'inhibition de l'activité d'Arp2/3 par le CK666 normalise les mouvements erratiques du nuage sous-cortical d'actine et les défauts de positionnement du fuseau mitotique dans les cellules suivant la déplétion de BAG3.

Le graphique décrit le pourcentage de cellules avec un mouvement polarisé ou erratique du nuage sous-cortical d'actine ou ne présentant pas de nuage dynamique sous-cortical d'actine (absent). À gauche, quantification des catégories du nuage d'actine dans la totalité des cellules analysées ou dans les cellules mitotiques défectueuses (panel de droite, i.e. oscillation du fuseau mitotique et retard de la progression des cellules en prométa- et métaphase). Des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose par la méthode du double blocage à la thymidine (2 mM, 16 h), infectées avec l'Ad-Life-Act-GFP (1PFU) et le baculovirus α -tubuline-RFP (4PFU) et transfectées avec un siCtl ou un siBAG3 (siBAG3#3). 30 minutes avant le début de l'acquisition les cellules ont été traitées avec du CK666 (40 μ M) et les images en cellules vivantes ont été acquises par microscopie confocale de type « spinning disc » pendant une période de 75 minutes à des intervalles de 90 secondes. Les moyennes \pm SEM sont représentatives de 3 expériences indépendantes où 113 à 146 cellules ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher et concernant le mouvement erratique n.s., $p=0,3620$ et $p=0,7556$,

comparent la condition siCtl aux conditions siCtl + CK666 et siBAG3 + CK666 respectivement, ****, $p<0,0001$, compare la condition siCtl à la condition siBAG3; concernant le mouvement polarisé n.s., $p=0,4434$ et $p=0,5089$, compare la condition siCtl aux conditions siBAG3 et siBAG3 + CK666 respectivement, ****, $p<0,0001$, compare la condition siCtl à la condition siCtl + CK666 ; concernant la catégorie absent **, $p=0,0027$, compare la condition siCtl à celle siCtl + CK666, ****, $p<0,0001$, compare la condition siCtl à celle si BAG3, n.s., $p=0,2822$, compare la condition siCtl à celle siBAG3 + CK666. Concernant les cellules mitotiques défectueuses, l'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher et ****, $p<0,0001$, compare la condition siCtl aux conditions siCtl + CK666 et siBAG3, *, $p=0,0272$ compare la condition siCtl à la condition siBAG3 + CK666.

Comme attendu, le traitement des cellules contrôles avec le CK666 a induit une augmentation de 1,5 fois de la proportion de cellules ne présentant pas de structures sous-corticales dynamiques de F-actine (panel de gauche, fig. 4.6). Ce résultat suggère que la formation de cette structure dynamique d'actine est diminuée rapidement après l'inhibition de l'activité d'Arp2/3 ce qui concorde avec les travaux de Mitsushima et al. qui ont montré que la formation du nuage sous-cortical d'actine est inhibée par la déplétion d'Arp3 (Mitsushima et al. 2010).

De manière importante, nous avons mis en évidence en cytokinèse que l'accumulation de F-actine à l'anneau contractile induite suivant la déplétion de HSPB8 peut être normalisée en inhibant l'activité du complexe Arp2/3, suggérant que le complexe chaperon BAG3-HSPB8 limiterait l'activité d'Arp2/3 pendant la cytokinèse (Varlet et al, 2017). Nous avons donc voulu évaluer si l'inhibition d'Arp2/3 dans les cellules mitotiques déplétées en BAG3 pouvait normaliser la dynamique polarisée du nuage sous-cortical de F-actine. Des cellules HeLa-RFP-H2B synchronisées en mitose déplétées en BAG3 et exprimant la sonde LifeAct-GFP et α -tubuline-RFP ont été traitées avec le CK666 30 minutes avant le début de l'acquisition en temps réel. Comme observé précédemment, la déplétion de BAG3 a augmenté significativement la proportion de cellules présentant un nuage sous-cortical avec un mouvement erratique (21% dans les cellules contrôles traitées au DMSO comparé à 53% dans les cellules déplétées en BAG3, fig. 4.6, panel de gauche). Nous avons également noté une élévation du pourcentage de cellules qui possèdent un nuage dynamique dans les cellules déplétées en BAG3 par rapport aux cellules contrôles (catégorie erratique + polarisée, ~90% pour le siBAG3 versus 60% pour le siCtl, fig. 4.6, panel de gauche), suggérant une potentielle polymérisation excessive d'actine suivant la déplétion de BAG3. De façon remarquable, le traitement des cellules déplétées en BAG3 avec le CK666 a réduit significativement, à des niveaux proches des conditions contrôles, non seulement la proportion globale de cellules présentant un nuage dynamique (catégorie erratique + polarisée, ~67% comparé à ~60% dans les cellules contrôles traitées au DMSO, fig. 4.6, panel de gauche), mais aussi la proportion de cellules avec un mouvement erratique du nuage sous-cortical d'actine (~24% comparé à ~21% dans les cellules contrôles traitées au DMSO, fig. 4.6, panel de gauche). Ces observations suggèrent que la dynamique du nuage sous-cortical d'actine est altérée en réponse à la déplétion de BAG3 et que ceci peut être corrigé par l'inhibition d'Arp2/3. Ainsi, les mouvements erratiques du nuage sous-cortical d'actine observés suivant la déplétion de BAG3 seraient la conséquence d'une polymérisation excessive de l'actine branchée induite par Arp2/3. Ceci suggère que le co-chaperon BAG3 modulerait la dynamique d'actine au sein du nuage sous-cortical d'actine en limitant l'activité d'Arp2/3. L'ensemble de ces observations sont en corrélation avec nos

observations pendant la cytokinèse (Varlet et al, 2017), et suggèrent que le complexe chaperon BAG3-HSPB8 limite l'activité d'Arp2/3 de l'entrée des cellules en mitose à la cytokinèse.

Nos résultats combinés aux données de la littérature corroborent un lien potentiel entre le mouvement du nuage sous-cortical d'actine et le positionnement du fuseau mitotique (fig. 4.5C, panel de gauche, Fink et al, 2011), suggérant que le nuage d'actine contribue aux forces qui guident le positionnement du fuseau mitotique. Puisque le traitement avec le CK666 restaure le mouvement polarisé du nuage sous-cortical d'actine dans les cellules déplétées en BAG3, nous avons analysé si le CK666 corrige également le positionnement du fuseau mitotique. Comme démontré préalablement, le pourcentage de cellules traitées au DMSO avec une mitose défectueuse, caractérisée par des anomalies de positionnement du fuseau mitotique et/ou un délai de la progression des cellules mitotiques, a été augmenté de manière significative par la déplétion de BAG3 par rapport aux cellules contrôles (~54 % de défauts pour la condition siBAG3 contre ~25% pour les cellules contrôles, fig. 4.6, panel de droite). De plus, nous avons également constaté que la majeure proportion des cellules présentant un mouvement erratique du nuage d'actine correspond à des cellules mitotiques défectueuses. De façon notable, nous avons observé une augmentation de 2 fois de la proportion de cellules présentant une mitose défectueuse dans les cellules contrôles traitées au CK666 (~60% contre ~25% dans les cellules contrôles, fig. 4.6, panel de droite). Cette observation suggère ainsi que la disparition du nuage sous-cortical d'actine suite au traitement avec le CK666 (fig. 4.6, panel de droite) corrèle avec une augmentation de défauts de positionnement du fuseau. À l'opposé, le traitement au CK666 des cellules déplétées en BAG3 a induit une réduction de 1,5 fois de la proportion de cellules présentant une mitose défectueuse (fig. 4.6, panel de droite). Ces résultats suggèrent donc que de tels défauts seraient liés à la dynamique altérée du nuage sous-cortical d'actine observée dans les cellules déplétées en BAG3. Aussi, bien que l'inhibition d'Arp2/3 interfère avec la progression mitotique des cellules contrôles, celle-ci corrige en partie les défauts mitotiques dans les cellules déplétées en BAG3. Ceci suggère que ces défauts seraient la conséquence d'une dérégulation de l'activité d'Arp2/3 et que celle-ci doit être finement balancée pour assurer la progression adéquate des cellules pendant la mitose.

Pour conclure, nos travaux montrent que le co-chaperon BAG3 faciliterait la polarisation du nuage sous-cortical d'actine. Les résultats obtenus ici suggèrent également que le complexe chaperon BAG3-HSPB8-p62 aiderait au positionnement du fuseau mitotique à travers la limitation de l'activité d'Arp2/3 requise pour la polarisation du nuage sous-cortical d'actine. En outre, deux des sept sous-unités du complexe Arp2/3, ArpC2 et ArpC1A, ont été retrouvées dans l'interactome de

BAG3 (Chen et al, 2013 ; Hein et al, 2015), corroborant nos observations et soulignant un possible lien physique entre le complexe chaperon et le complexe nucléateur de l'actine.

Les résultats présentés dans les fig. 4.3 et 4.4 suggèrent que BAG3-HSPB8 pourrait limiter l'activité de HDAC6 sur cortactine en facilitant la dissociation des deux protéines. Or cortactine influence l'activation du complexe Arp2/3. Ainsi, nous avons raisonné que le complexe chaperon BAG3-HSPB8 pourrait limiter l'activité d'Arp2/3 en modulant l'activité déacétylase de HDAC6 sur cortactine. Afin de déterminer un lien potentiel entre le nuage sous-cortical d'actine et l'activité de HDAC6, nous avons examiné l'effet de l'inhibition de HDAC6 par la tubacine sur la dynamique du nuage sous-cortical d'actine (Haggarty et al. 2003; Schölz et al. 2015). Nous avons aussi évalué si l'inhibition de l'activité de HDAC6 pourrait corriger les mouvements erratiques du nuage induits par la déplétion de BAG3. Pour cela, des expériences d'imagerie en temps réel ont été réalisées dans des cellules HeLa-RFP-H2B synchronisées en mitose, déplétées en BAG3 et exprimant la sonde LifeAct-GFP et α -tubuline-RFP. Les cellules ont été traitées avec 5 μ M de tubacine pendant 8 heures avant le début de l'acquisition en temps réel (fig. 4.7).

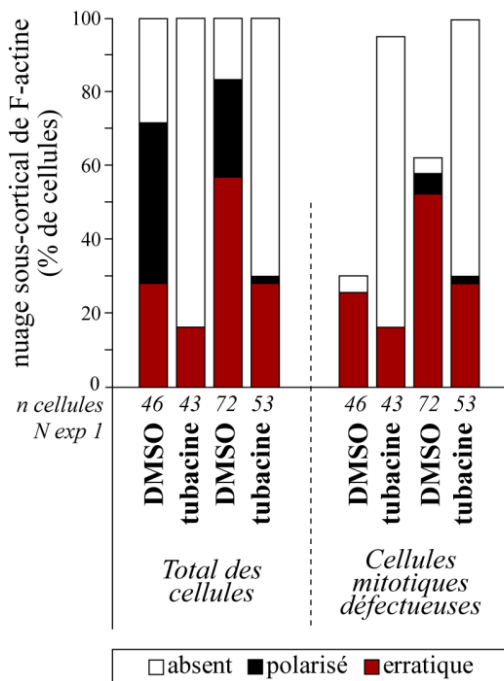


Figure 4.7 : La tubacine, un inhibiteur sélectif de HDAC6, induit des défauts de formation du nuage d'actine sous-cortical. Histogramme représentant le pourcentage de cellules arborant un mouvement polarisé ou erratique du nuage sous-cortical d'actine ou ne présentant pas de nuage sous-cortical d'actine (absent) en réponse au traitement avec la tubacine ou le contrôle DMSO. Quantification des différentes catégories du nuage d'actine dans la totalité des cellules analysées (gauche) ou dans les cellules mitotiques défectueuses (droite, i.e. oscillation du fuseau mitotique et retard de la progression des cellules en prométa- et métaphase). Des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose par un double blocage à la thymidine, infectées avec l'Ad-Life-Act-GFP (1PFU) et le baculovirus α -tubuline-RFP (4PFU) et transfectées avec un siCtl ou un siBAG3 (siBAG3#3). Durant les 8 h de la seconde relâche les cellules ont été traitées avec la tubacine (5 μ M) et les images ont été acquises par microscopie confocale de type « *spinning disc* » pendant une période de 75 minutes à des intervalles de 90 secondes. Les résultats sont représentatifs d'une expérience.

Nous avons observé que le traitement avec la tubacine a eu un impact marqué sur la formation du nuage sous-cortical d'actine qui s'est traduit par la disparition de ce dernier dans les cellules contrôles (fig. 4.7, panel de gauche). De plus, les défauts de positionnement du fuseau ont été augmentés drastiquement dans les cellules contrôles traitées à la tubacine (fig. 4.7, panel de droite).

Ce résultat suggère que l'activité de HDAC6 est requise pour la formation et la dynamique du nuage sous-cortical d'actine ainsi que pour le positionnement du fuseau mitotique et la progression des cellules mitotiques. Ceci met aussi en avant que l'inhibition de HDAC6 pendant la mitose mime l'inhibition de l'activité du complexe Arp2/3 (fig. 4.6 et 4.7). De plus, alors que nous avons observé que ~80% de cellules déplétées en BAG3 présentent un nuage sous-cortical d'actine, nous avons noté que la tubacine induit une forte diminution de la présence du nuage d'actine dans ces cellules (~30%, fig. 4.7, panel de droite). Ainsi, ce résultat suggère que l'activité de HDAC6 est essentielle pour la formation du nuage sous-cortical d'actine. Ceci suggère également que l'utilisation de la tubacine à 5 μ M conduit à une inhibition trop drastique pour étudier la dynamique du nuage d'actine. Il est à noter que bien que la tubacine ait une activité sélective démontrée pour HDAC6 (Schölz et al. 2015), ces résultats devront être validés par l'utilisation d'une approche plus spécifique pour l'inhibition de HDAC6, comme l'utilisation de lignées CRISPR/Cas9.

Nous avons ensuite tenté de restaurer les mouvements erratiques du nuage d'actine induits par la déplétion de BAG3 avec une faible dose de tubacine, pour tenter de normaliser l'activité de HDAC6 dans ces cellules. Des expériences d'imagerie en temps réel dans des cellules HeLa-RFP-H2B synchronisées en mitose, déplétées en BAG3 et exprimant les sondes LifeAct-GFP et α -tubuline-RFP ont été traitées avec 20 nM de tubacine pendant 30 minutes avant l'acquisition d'images en temps réel.

Dans les cellules contrôles, nous avons constaté que le traitement avec 20 nM de tubacine n'a pas induit la disparition du nuage sous-cortical d'actine (fig. 4.8, panel de gauche) mais a conduit à une augmentation de la proportion de cellules présentant un mouvement erratique du nuage sous-cortical d'actine ainsi que de la proportion de cellules mitotiques défectueuses (fig. 4.8). Ceci suggère que l'utilisation à plus faible dose de la tubacine, et donc probablement une inhibition moins drastique de l'activité de HDAC6, interfère avec la dynamique polarisée du nuage mais ne conduit pas à l'inhibition de sa formation. Ce résultat suggère donc que l'activité de HDAC6 est requise pour réguler la polarisation du nuage sous-cortical en plus de sa formation.

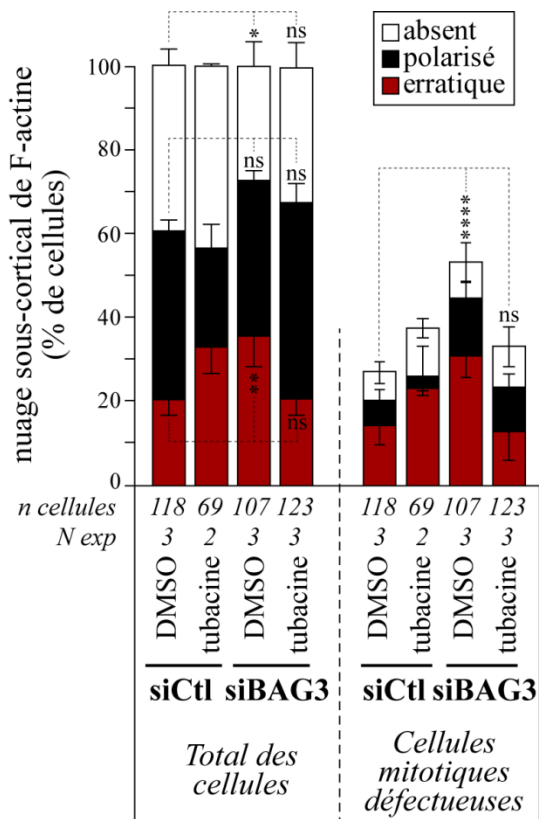


Figure 4.8 : L'inhibition de l'activité de HDAC6, avec une faible dose de tubastatin A, normalise les mouvements erratiques du nuage ainsi que les défauts de positionnement du fuseau mitotique en réponse à la déplétion de BAG3.

Graphique représentant le pourcentage de cellules arborant un mouvement polarisé ou erratique du nuage sous-cortical d'actine ou ne présentant pas de nuage sous-cortical d'actine (absent) en réponse au traitement avec la tubastatin A ou le contrôle DMSO dans des cellules contrôles (siCtl) ou déplétées en BAG3 (siBAG3#3). Quantification des catégories du nuage d'actine dans la totalité des cellules analysées (gauche) ou dans les cellules mitotiques défectueuses (droite). Le même protocole que la fig. 4.7 a été employé. Trente minutes avant le début de l'acquisition des images, par microscopie confocale de type « *spinning disc* » pendant une période de 75 minutes à des intervalles de 90 secondes, les cellules ont été traitées avec 20 nM de tubastatin A. Les moyennes +/- SEM sont représentatives de 2 ou 3 expériences indépendantes où au moins 69 cellules ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher et concernant la catégorie erratique, **, p=0,0049 compare la condition siCtl à la condition siBAG3 et n.s., p=1, compare la condition siCtl à celle siBAG3 + tub ; concernant la catégorie polarisé, n.s., p=0,5855 et p=0,4372, comparent la condition siCtl aux conditions siBAG3 et siBAG3 + tub respectivement ; concernant la catégorie absent, *, p=0,0352, compare la condition siCtl à celle siBAG3 et n.s., p=0,4244, compare la condition siCtl à celle siBAG3 + tub. Concernant les défauts de positionnement du fuseau mitotique +/- retard de la progression mitotique, **** p<0,0001 compare siCtl à la condition siBAG3 et n.s.=0,3277 compare siCtl à la condition siBAG3+tubastatin A.

Il est à noter qu'une inhibition possiblement partielle de l'activité de HDAC6 avec ce traitement a mimé la déplétion de BAG3 sur la dynamique polarisée du nuage sous-cortical d'actine (~32% dans les cellules contrôles traitées avec la tubastatin A comparé à ~37% dans les cellules déplétées en BAG3, fig. 4.8, panel de gauche). *A contrario*, ce même traitement dans les cellules déplétées en BAG3 a induit une réduction d'environ 2 fois du pourcentage de cellules avec un mouvement erratique du nuage sous-cortical d'actine (fig. 4.8, panel de gauche) ainsi qu'une diminution de la proportion des cellules mitotiques défectueuses (fig. 4.8, panel de droite). Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de HDAC6 a un effet opposé dans les cellules contrôles versus les cellules déplétées en BAG3. Puisque l'inhibition de l'activité de HDAC6 peut corriger les mouvements erratiques suivant la déplétion de BAG3, ceci suggère également que BAG3-HSPB8 pourrait réguler négativement l'activité de HDAC6.

Ensemble, ces résultats suggèrent que le complexe BAG3-HSPB8 pourrait agir en limitant localement la polymérisation d'actine dépendante d'Arp2/3 pour faciliter la dynamique du nuage sous-cortical. En amont, ce mécanisme pourrait impliquer un effet inhibiteur de BAG3-HSPB8 sur l'activité de HDAC6 via la modulation de son association à cortactine pendant la mitose.

4.6. Rôle de HDAC6 dans le processus d'arrondissement mitotique régulé par le complexe BAG3-HSPB8-p62.

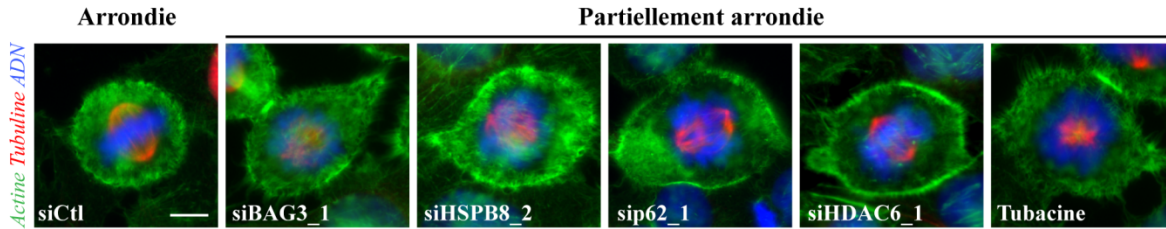
L'entrée des cellules en mitose s'accompagne d'un remodelage drastique de l'architecture cellulaire passant d'une géométrie plane à sphérique nécessitant le désassemblage des adhésions focales et la formation d'un cortex d'actomyosine rigide (Lancaster et Baum 2014). En outre, ces processus ont été reliés à une diminution de l'activité du complexe Arp2/3 (Rosa et al. 2015). Nous avons démontré que la déplétion de BAG3 interfère avec l'arrondissement des cellules à l'entrée en mitose et la formation du cortex rigide d'actomyosine. De plus, nous avons montré que la déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 est associée avec une dérégulation des structures d'actine dépendantes d'Arp2/3, et qui semblerait être reliée à une dérégulation de l'activité de HDAC6 (Varlet et al. 2017 ; fig. 4.6 à 4.8). Nous avons donc raisonné que l'activité du complexe chaperon pourrait moduler l'arrondissement mitotique en limitant l'activité de HDAC6.

Pour tester cette hypothèse, nous avons analysé l'arrondissement mitotique suivant la déplétion de l'une ou l'autre des protéines du complexe chaperon et de son effecteur présumé HDAC6. Pour ce faire, des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose et déplétées en BAG3, HSPB8, p62 ou HDAC6 et traitées avec 5 μ M de tubacine pendant 8h. Nous avons ensuite analysé par immunofluorescence la proportion de cellules arrondies mitotiques versus la proportion de cellules partiellement arrondies dans les différentes conditions (fig. 4.9).

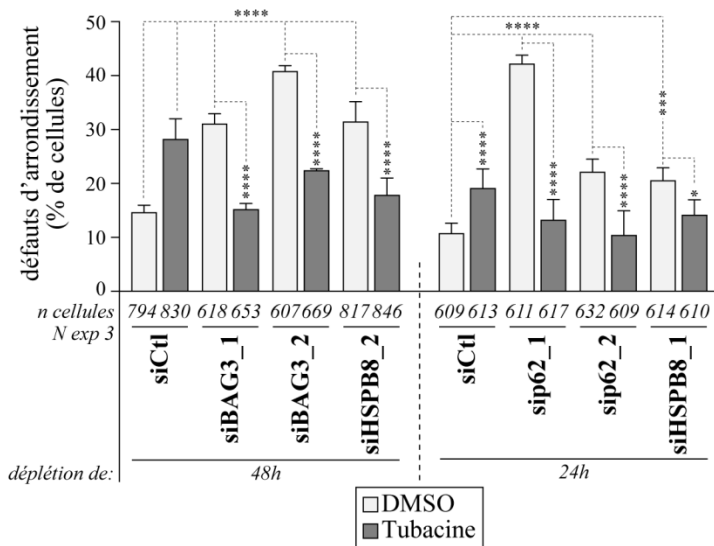
Nous avons observé que la déplétion de HSPB8 tout comme celle de p62 ou de HDAC6 a conduit à une augmentation significative, de 2 à 4 fois, de la proportion de cellules présentant des défauts d'arrondissement par rapport aux cellules contrôles (fig. 4.9). Le traitement des cellules contrôles mitotiques avec la tubacine a conduit également à une élévation de la proportion de défauts d'arrondissement (~30% de défauts pour les cellules traitées à la tubacine comparé à ~15% pour les cellules traitées au DMSO, fig. 4.9). Ce résultat suggère donc que la déplétion des partenaires de BAG3 récapitule les défauts d'arrondissement observés suivant la déplétion de BAG3. Ces observations suggèrent aussi que l'activité de la déacétylase HDAC6 serait impliquée dans le

remodelage du cytosquelette d'actine qui guide l'arrondissement cellulaire à l'entrée des cellules en mitose.

A



B



C

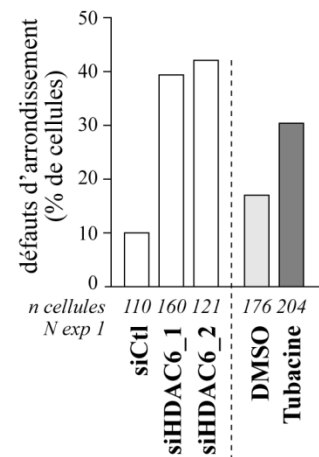


Figure 4.9 : La déplétion de BAG3-HSPB8-p62 induit des défauts d'arrondissement mitotiques qui sont normalisés par l'inhibition de HDAC6.

(A) Images d'épifluorescence montrant une cellule HeLa mitotique ronde typique (siCtl) par rapport à des cellules mitotiques partiellement arrondies (siBAG3, siHSPB8, sip62, siHDAC6, siCtl + tubacine). Des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose par un double blocage à la thymidine (2 mM, 16 h), transfectées avec un siCtl et 2 siARN différents pour BAG3, HSPB8, p62 et HDAC6 et traitées 8 h avec 5 μ M de tubacine. Les immunofluorescences ont été réalisées pour marquer la F-actine par la phalloïdine-488, le fuseau mitotique par l'anti- α -tubuline et l'ADN par le Hoechst; barre d'échelle, 10 μ m. (B) Histogramme représentant le pourcentage de cellules HeLa-RFP-H2B avec des défauts d'arrondissement mitotique (cellules partiellement ou non arrondies) après 48 h de déplétion de BAG3 ou de HSPB8 avec les siBAG3#1, siBAG3#2 et siHSPB8#2 ou 24 h de déplétion de HSPB8 et de p62 avec les sip62#1, sip62#2 et siHSPB8#1. Les moyennes \pm SEM sont représentatives de 3 expériences indépendantes où 609 à 846 cellules ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher et ****, $p < 0,0001$ compare la condition siCtl aux conditions siBAG3#1, siBAG3#2, siHSPB8#2 et sip62#1; *, $p < 0,0383$ compare la condition siCtl à la condition siHSPB8#1; *, $p < 0,0255$ compare la condition siCtl à celle sip62#2. $n.s. = 0,7116$ compare la condition siCtl à la condition siBAG3#1+tubacine ; ***, $p = 0,0001$ compare la condition siCtl à la condition siBAG3#2+tubacine et **** $p < 0,0001$ compare la condition siBAG3#2 à la condition siBAG3#2+tubacine ; $n.s. = 0,0836$ compare la condition siCtl à la condition siHSPB8#1+tubacine ; $n.s. = 0,1072$ compare la condition siCtl à la condition siHSPB8#2+tubacine ; $n.s. = 0,1900$ compare la condition siCtl à la condition sip62#1+tubacine et $n.s. = 0,9261$ compare la condition siCtl à celle sip62#2. (C) Graphique montrant le pourcentage de cellules HeLa-RFP-H2B avec des défauts d'arrondissement mitotique

(cellules partiellement ou non arrondies) après 48 h de déplétion de HDAC6 (siHDAC6#1 et 2) ou après traitement avec 5 μ M de tubacine pendant 8 h. Les résultats sont représentatifs d'une expérience.

Nous avons ensuite testé si l'inhibition de HDAC6 pouvait normaliser l'arrondissement mitotique dans les cellules déplétées en BAG2, HSPB8 ou p62, comme c'est le cas pour la dynamique du nuage sous-corticale d'actine. Des cellules HeLa synchronisées en mitose et déplétées en BAG3, HSPB8 ou p62 ont donc été traitées avec 5 μ M de tubacine durant 8 heures et la proportion de défauts d'arrondissement mitotique a été examinée par immunofluorescence (fig. 4.9). Le traitement avec la tubacine des cellules déplétées en BAG3, HSPB8 ou p62 a induit une réduction significative d'au moins 2 fois de la proportion de cellules présentant des défauts d'arrondissement mitotique (fig. 4.9). Des expériences similaires ont été réalisées dans les cellules HeLa parentales CCL2 (fig. S4.2) et ont révélées une augmentation significative des défauts d'arrondissement en réponse à la déplétion des protéines du complexe chaperon qui ont été corrigés par le traitement avec la tubacine.

Notamment, l'inhibition d'Arp2/3, par le CK666, dans des cellules mitotiques suivant la déplétion de BAG3 a diminué le pourcentage de défauts d'arrondissement (fig. 4.10), suggérant une dérégulation de l'activité Arp2/3 dans ces cellules. Cette observation corrobore nos résultats précédents qui suggèrent que BAG3-HSPB8 pourrait limiter l'activité du complexe Arp2/3 dans des processus requérant une haute dynamique de l'actine comme le nuage sous-cortical en mitose ou le désassemblage de l'anneau contractile en cytokinèse (Varlet et al, 2017).

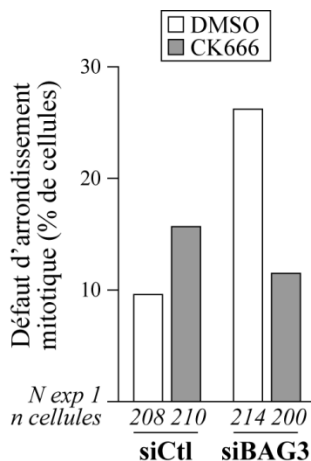


Figure 4.10 : L'inhibition d'Arp2/3 corrige les défauts d'arrondissement dans les cellules mitotiques déplétées en BAG3.

Graphique représentant le pourcentage de cellules mitotiques avec des défauts d'arrondissement (cellules partiellement ou non arrondies) dans des cellules HeLa-RFP-H2B transfectées avec un siRNA contrôle (siCtl) ou un siARN spécifique de BAG3 (siBAG3#1) pendant 48 h, synchronisées en mitose par la méthode de double blocage à la thymidine (2 mM) et traitées pendant les 8 h de la seconde relâche avec le CK666 (40 μ M). Les résultats sont représentatifs d'une expérience.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggèrent qu'en l'absence d'un complexe chaperon BAG3-HSPB8-p62 fonctionnel, une dérégulation des activités HDAC6 et Arp2/3 contribue à augmenter la prévalence des défauts d'organisation des structures mitotiques à base d'actine qui guident l'orientation du fuseau mitotique, lesquels sont associés à des retards de la progression mitotique et accompagnés d'anomalies de la ségrégation des chromosomes.

4.7. Un mutant non-acétylable de cortactine phénotype la déplétion de BAG3-HSPB8 sur l'arrondissement cellulaire tandis qu'un mutant acétyl-mimétique restaure le phénotype.

Jusqu'ici, nos résultats suggèrent que l'activité déacétylase de HDAC6 sur la cortactine doit être limitée pour assurer le remodelage des structures mitotiques à base d'actine et que BAG3-HSPB8 serait impliqué. Afin de renforcer ce modèle, nous avons tiré profit de mutants d'acétylation de cortactine afin d'évaluer si la régulation de l'acétylation de cortactine pourrait être un mécanisme moléculaire par lequel BAG3-HSPB8 modulerait la dynamique de l'actine au cours de la mitose. Nous avons donc examiné l'effet de l'expression de mutants de cortactine non-acétylable (cortactine-9KR) ou acétyl-mimétique (cortactine-9KQ ; Zhang et al., 2007) sur les défauts d'arrondissement mitotique induits par la déplétion de BAG3 ou de HSPB8. Pour ce faire, des cellules HeLa-RFP-H2B synchronisées en mitose et déplétées en HSPB8 ou en BAG3 ont été transfectées avec les mutants de cortactine (fig. 4.11A). Les défauts d'arrondissement ont été quantifiés par immunofluorescence.

Nous avons constaté que l'expression du mutant cortactine-9KR a induit une augmentation significative du pourcentage de cellules présentant des défauts d'arrondissement mitotique par rapport aux cellules contrôles transfectées avec le vecteur vide (EV, ~20% de défauts d'arrondissement versus ~40% après expression de cortactine-9KR, fig. 4.11B et C). Ainsi, l'expression du mutant de cortactine non-acétylable interfère avec l'arrondissement des cellules mitotiques tout comme observé suivant la déplétion de BAG3 ou de HSPB8 (~40% de défauts pour les 2 siARN, fig. 4.11B et C). À l'inverse, nous avons remarqué que l'expression du mutant cortactine-9KQ n'a pas augmenter les défauts d'arrondissement mitotique dans les cellules contrôles (~20% de défauts d'arrondissement, comme observé dans les cellules EV, fig. 4.11B et C). De surcroît, ce mutant a diminué le pourcentage de défauts d'arrondissement mitotique dans les cellules déplétées en BAG3 ou HSPB8 (~20% de défauts, proche de la condition siCtl+EV, fig. 4.11B et C).

Ces observations suggèrent que l'expression du mutant acétyl-mimétique de cortactine normaliserait l'arrondissement mitotique des cellules déplétées en BAG3 ou HSPB8.

Sur la base de ces résultats, on peut spéculer que les défauts de remodelage du cytosquelette d'actine observés suivant la déplétion de BAG3 ou de HSPB8 seraient la conséquence en partie d'une diminution de l'acétylation de cortactine, laquelle est stimulée à l'entrée des cellules en mitose. L'ensemble de ces observations corrèlent avec l'hypothèse selon laquelle BAG3-HSPB8 modulerait négativement l'activité de HDAC6 sur cortactine pour faciliter l'arrondissement et pourrait d'autre part localement limiter l'activité de HDAC6 pour réguler l'activité Arp2/3 nécessaire à la dynamique du nuage sous-cortical d'actine. Pour confirmer cette hypothèse, l'effet d'un mutant de cortactine incapable d'activer Arp2/3 (Urano et al. 2001) pourrait être analysé sur les défauts mitotiques associés à la déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62. La restauration des défauts d'arrondissement mitotique et de dynamique du nuage sous-cortical d'actine dans ces conditions permettrait de confirmer notre hypothèse.

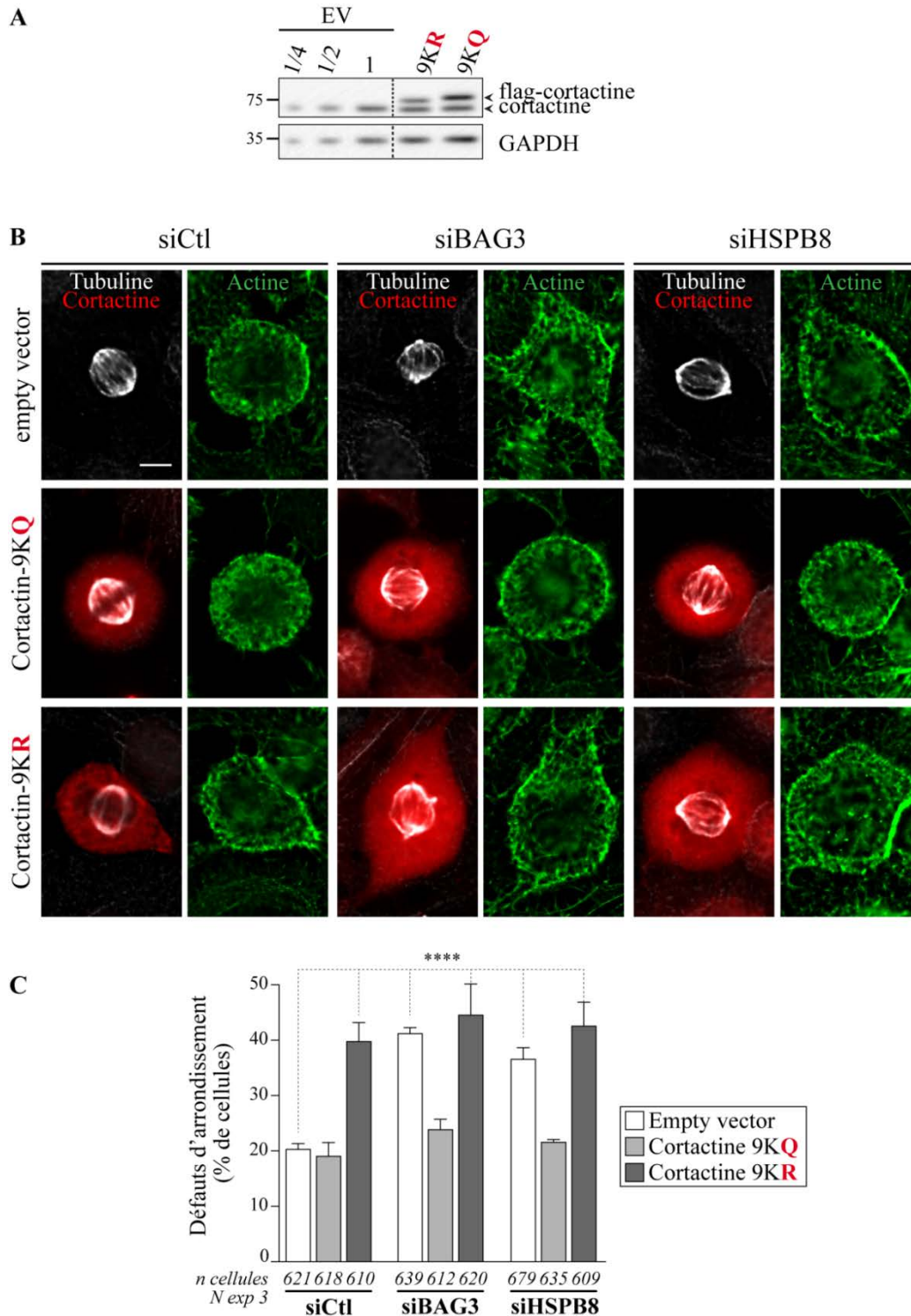


Figure 4.11 : Le mutant acétyl-mimétique de cortactine normalise les défauts d'arrondissement mitotique induit par la déplétion de BAG3, tandis que le non-acétylable mime les défauts.

(A) WB d'extraits protéiques de cellules HeLa-RFP-H2B montrant le niveau d'expression des mutants de cortactine (9KQ et 9KR) par rapport à l'expression endogène de cortactine (vecteur vide, EV). Les cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose par la méthode de double blocage à la thymidine (2 mM, 16h), transfectées durant 32 h avec des vecteurs codant pour des mutants de cortactine (9KQ et 9KR)

étiquetés 3X-FLAG ou par un vecteur vide (EV) et transfectées 48 h avec des siARN spécifiques pour BAG3 (siBAG3#1), HSPB8 (siHSPB8#2) ou un siCtl. L'analyse par immunobuvardage a été réalisée avec un anti-cortactine; GAPDH: contrôle de dépôt. **(B)** Les images déconvoluées d'épifluorescence de cellules traitées selon le protocole décrit en A présentant une restauration de l'arrondissement mitotique dans les cellules déplétées en BAG3 ou en HSPB8 après expression du mutant cortactine-9KQ et un mime du défaut d'arrondissement dans les cellules contrôles (siCtl) après l'expression du mutant cortactine-9KR. Les immunofluorescences ont été réalisées avec un anti-FLAG pour marquer cortactine exogène, un anti- α -tubuline pour marquer les microtubules (fuseau mitotique), la phalloïdine-488 pour marquer la F-actine et le Hoechst pour marquer l'ADN; barre, 10 μ m. **(C)** Le graphique représente le pourcentage de cellules avec des défauts d'arrondissement mitotique, quantifié à partir des IF en B, après expression des mutants cortactine-9KR et 9KQ dans les cellules mitotique déplétées en BAG3 ou HSPB8 ou dans les cellules contrôles (siCtl); moyennes +/- SEM représentatives de 3 expériences indépendantes où au moins 609 cellules ont été quantifiées. ****, $p < 0,0001$ compare la condition siCtl+EV aux conditions siCtl+9KR, siHSPB8+EV, siBAG3+9KR, siBAG3+EV, siBAG3+9KR par le test exact de Fisher.

4.8. Conclusion.

Le présent chapitre, qui visait à élucider le mécanisme moléculaire par lequel BAG3 facilite le remodelage des structures à base d'actine pendant la mitose, fournit des évidences qui permettent de spéculer que le complexe BAG3-HSPB8, modulerait l'activité de HDAC6 sur cortactine, potentiellement dès la phase G2/M. Ceci est entre autres appuyé par la stimulation importante de l'association de BAG3 à HDAC6 en G2/M, accompagnée du changement de localisation de HDAC6 dépendant de BAG3. Puis à l'entrée des cellules en mitose, nous postulons que la modulation de l'activité de HDAC6 sur cortactine par BAG3-HSPB8 s'effectuerait à travers le recrutement de p62. En effet, nous avons démontré dans le chapitre 2 que le complexe tertiaire BAG3-HSPB8-p62 s'autorégule durant la mitose et, en plus de s'associer plus fortement à BAG3 pendant la mitose, la déplétion de p62 phénocopie les défauts mitotiques induits par la déplétion de BAG3 ou HSPB8. Ceci renforce l'hypothèse que la formation de ce complexe pourrait être importante pour la fonction mitotique de BAG3. D'ailleurs, il apparaît que le mode de régulation de HDAC6 par BAG3 pourrait être complexe et potentiellement différent pendant la phase G2/M et pendant la mitose. Dans le chapitre 6, nous discuterons en détail d'un modèle du potentiel mécanisme moléculaire orchestré par BAG3 pour moduler l'activité de la déacétylase HDAC6.

4.9. Figures supplémentaires.

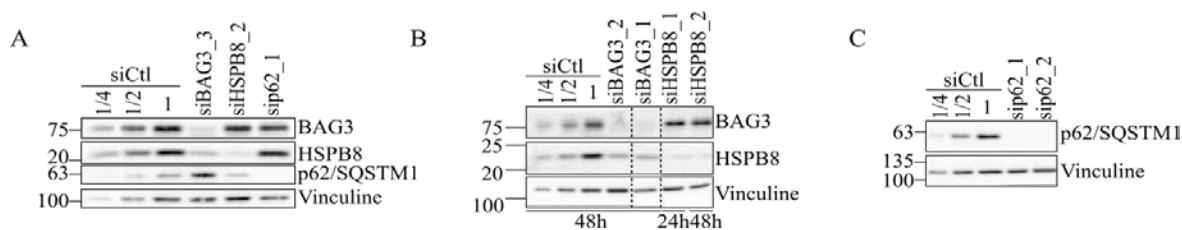


Figure S4.1 : Mesure de l'efficacité de la déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 par WB.

(A) WB représentatif d'extraits protéiques provenant de cellules HeLa-RFP-H2B montrant l'efficacité de la déplétion de BAG3, HSPB8 et p62 48 h après la transfection de siARN spécifiques. Le niveau de déplétion a été estimé à plus de 75% par un dépôt de quantités croissantes d'extrait contrôle (siCtl). L'analyse par immunobuvardage a été réalisée avec des anticorps anti-BAG3, anti-HSPB8 et anti-p62; vinculine: contrôle de dépôt. (B) WB représentatif d'extraits protéiques provenant de cellules HeLa-RFP-H2B montrant l'efficacité de la déplétion de BAG3 et HSPB8, 48 h ou 24 h après la transfection de siARN spécifiques. La déplétion a été estimée à plus de 75% par un dépôt de quantités croissantes d'extrait contrôle (siCtl). L'analyse par immunobuvardage a été réalisée avec des anticorps anti-BAG3 et anti-HSPB8; vinculine: contrôle de dépôt. (C) WB représentatif d'extraits protéiques provenant de cellules HeLa-RFP-H2B montrant l'efficacité de la déplétion de p62 24 h après la transfection de siARN spécifiques. La déplétion a été estimée à plus de 75% par un dépôt de quantités croissantes d'extrait contrôle (siCtl). L'analyse par immunobuvardage a été réalisée avec un anticorps anti-p62; vinculine: contrôle de dépôt.

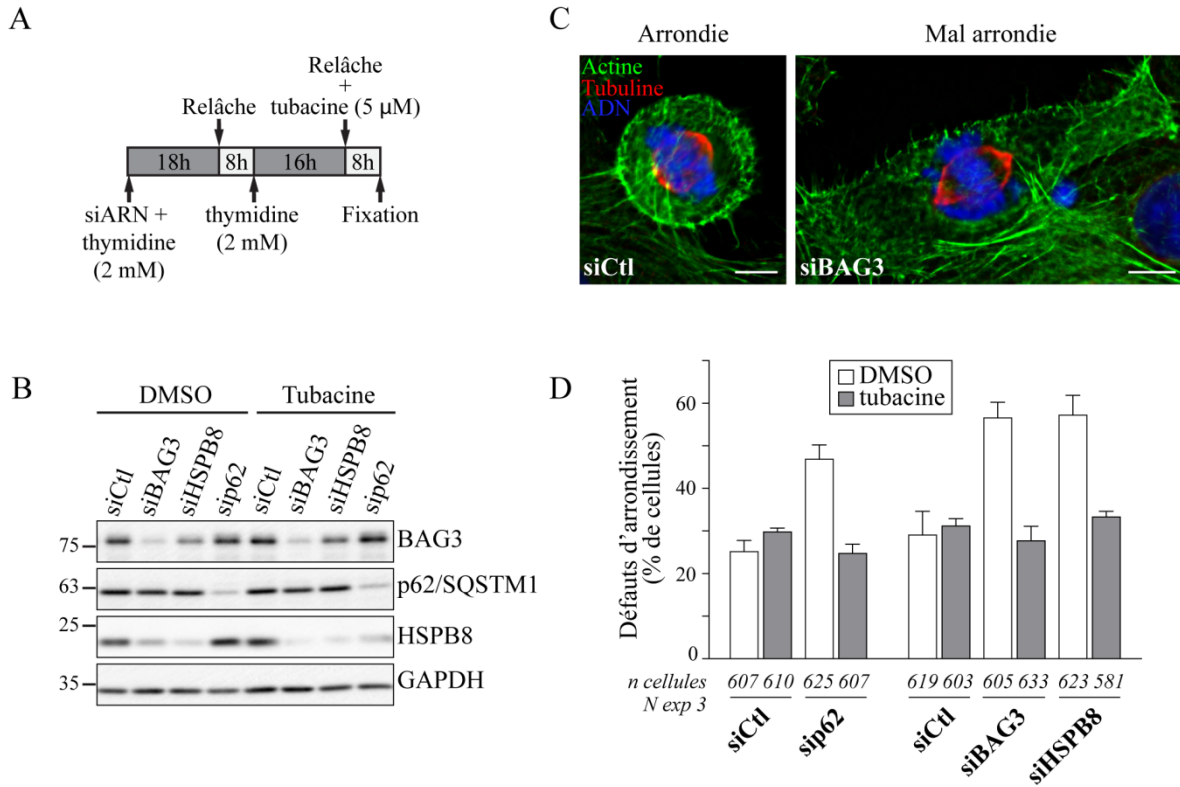


Figure S4.2 : L'inhibition de l'activité de HDAC6 normalise les défauts d'arrondissement mitotiques associés à la déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 dans les cellules HeLa parentales CCL2.

(A) Schéma du protocole utilisé pour examiner les défauts d'arrondissement mitotiques dans les cellules HeLa parentales CCL2. Les cellules ont été synchronisées en mitose par la méthode de double blocage à la thymidine (2 mM) et transfectées 24 h avec un siCtl ou le sip62#1 ou 48 h avec les siBAG3#1 et siHSPB8#2. (B) WB représentatif d'extraits protéiques provenant de cellules traitées comme en (A) montrant l'efficacité de la déplétion de BAG3, HSPB8 et p62 24 ou 48 h après transfection avec les siARN spécifiques. L'analyse par immunobuvardage a été réalisée avec des anticorps anti-BAG3, anti-HSPB8 et anti-p62; GAPDH: contrôle de dépôt. (C) Images d'épifluorescence déconvoluées montrant une cellule HeLa parentales CCL2 mitotique ronde typique (siCtl) par rapport à une cellule mitotique partiellement arrondie (siBAG3); la F-actine a été marquée par la phalloïdine-488, le fuseau mitotique par l'anti- α -tubuline et l'ADN par le Hoechst; barres d'échelle, 10 μ m. (D) Histogramme représentant le pourcentage de cellules avec des défauts d'arrondissement mitotique (cellules partiellement ou non arrondies) après 48 h de déplétion de BAG3 ou de HSPB8 (gauche) ou 24 h de déplétion de p62 (droite). Les moyennes \pm SEM sont représentatives de 3 expériences indépendantes où 603 à 633 cellules ont été analysées. L'analyse statistique a été effectuée par le test de Fisher et ****, $p < 0,0001$ compare la condition siCtl à celle siBAG3, siHSPB8 et sip62 ; n.s.= 0,8945 compare la condition siCtl à celle sip62+tubacine ; n.s.= 0,6376 compare la condition siCtl à celle siBAG3+tubacine et n.s.= 0,1184 compare la condition siCtl à celle siHSPB8+tubacine.

Chapitre 5 : Matériels et méthodes des chapitres 3, 4 et annexe 2

5.1. Vecteurs d'expression, infection, adénovirus et baculovirus recombinants.

Les mutants BAG3-GFP_S195A et BAG3-GFP_S385A-S386A ont été générés par mutagenèse dirigée par PCR à partir du plasmide BAG3-GFP_WT avec les amorces suivant:

BAG3_S195A.gen 5'- GCGATTCCGAACTGAGGCGGCAGGGCAGGCTCCTCAGAGG – 3' ;

BAG3_S195A.rev 5'- CCTCTGAGGAGCCTGCCCTGCCGCCTCAGTTCGGAATCGC – 3' ;

BAG3_S385-S386A.gen: 5'- CCT TCT GCT GTC CCC GCTGCC CCC AAG AG -3' ;

BAG3_S385-S386A.rev: 5'- CT CTT GGG GGCAGC GGG GAC AGC AGA AGG -3'. Les constructions ont été confirmées par analyse de la séquence ADN.

Les adénovirus recombinants conduisant l'expression de la protéine BAG3 étiquetée GFP WT, IPV [I9V/V98G/I208G/V210G], Δ PXXP (Δ 302–418), S284A-T285A, S385A-S386A, T285D et S195A, pour les expériences d'immunoprécipitation (chapitre 2 et 4, annexe 2), d'immunofluorescence pour l'enrichissement périnucléaire (chapitre 3) et de déplétion-restauration de phénotypes (chapitre 2 à 4), ont été produits par WelgenInc, Worcester, MA, et ont été amplifiés dans des cellules HEK293VR (don de Philip E.Branton, Département de Biochimie, Université McGill, Montréal, QC, Canada), comme décrit dans Fuchs et al. 2015. Tous les adénovirus recombinants ont été confirmés par séquençage des séquences insérées. Les titres de virus ont été déterminés en utilisant le kit de titrage AdenoX Rapid (Clontech Laboratories, #631028) en suivant les instructions du fabricant.

Pour les expériences de PLA (chapitre 4) le vecteur d'expression peGFP.N1-HDAC6 WT provenant d'Addgene (#36188) et le vecteur d'expression myc-cortactin WT (don du Dr X. Zhan, Department of Experimental Pathology, Jerome H. Holland Laboratory for the Biomedical Sciences, American Red Cross, Rockville, MD 20855, USA) ont été utilisés.

Les constructions 3XFLAG-cortactine 9KQ ou 9KR (les lysines (K) situées dans des régions de répétition ont été mutées en glutamine (Q) ou en arginine (R)) utilisées pour les expériences de restauration de l'arrondissement mitotique (chapitre 4) sont un don du Dr E. Seto (Washington University School of Medicine and Health Sciences, Washington, DC 20037, USA).

5.2. Lignées cellulaires, culture cellulaire, synchronisation et traitements.

Des cellules HeLa (Jones et al. 1971), des cellules HeLa-RFP-H2B (don du Dre Sabine Elowe, Département de Pédiatrie, Faculté de Médecine, Université Laval et Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université Laval ; Klebig, Korinth, et Meraldi 2009) et des cellules HeLa parentales CCL2 (ATCC) ont été maintenues dans du milieu essentiel α -minimal (α -MEM) complémenté de 10% de sérum bovin fœtal (FBS). Les lignées cellulaires HeLa-Flp-In-TREx-BAG3-GFP ont été maintenues dans du milieu α -MEM avec 10% FBS en présence de la blasticidine (5 ng/ml) et de l'hygromycine B (0,15 mg/ml) afin de maintenir le système d'induction éteint. La blasticidine et l'hygromycine ont été enlevées avant de réaliser les expériences. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans une atmosphère humidifiée avec 5 % de CO₂ à 37°C.

Les cellules ont été synchronisées en phase G2/M soit par un blocage à la thymidine (2 mM, 16 h) suivi de l'ajout de 8 μ M de RO3306 pendant 18 h soit par un traitement de 18 h avec 8 μ M de RO3306. Les cellules sont synchronisées en début de mitose (prophase tardive) par un traitement au nocodazole (de 40 à 400 ng/ml pendant 12 à 16 h) ou par un blocage à la thymidine (2 mM, 24 h), suivie d'une période de relâche de 3 h avant l'ajout de nocodazole (de 40 à 400 ng/ml pendant 12 à 16 h). Les extraits mitotiques sont préparés à partir des cellules mitotiques récupérées par agitation mécanique (« *shake off* »). Les cellules sont également synchronisées en mitose par un double blocage à la thymidine (2 mM pendant 16 h). Brièvement, dans la méthode de blocage à la thymidine, les cellules ont été incubées avec 2 mM de thymidine dans du milieu α -MEM sans désoxyribonucléosides et ribonucléosides additionné avec 10% de FBS (α -MEM minus) pendant 16 h, ont été lavées 3 fois et relâchées pendant 8 h dans du milieu frais, comme décrit précédemment (Fuchs et al., 2015). Après les 8 h de relâche, 2 mM de thymidine est ajouté pendant 16 h et les cellules sont relâchées une seconde fois durant 8 h dans du α -MEM complet.

Pour analyser l'impact de l'inhibition d'Aurora A sur la localisation de BAG3 par immunofluorescence, les drogues RO3306 à 8 μ M et MLN8237 à 0,5 μ M ont été ajoutée aux cellules en même temps et pendant 18 h pour les synchroniser en phase G2/M et inhiber Aurora A.

Pour analyser la correction de la dynamique du nuage sous-cortical d'actine par imagerie en temps réel, les drogues ont été ajoutées aux cellules qui ont été synchronisées en mitose par un double blocage à la thymidine 30 min avant l'imagerie en temps réel comme suit: tubacine, 20 nM; CK666, 40 μ M. Pour évaluer la restauration de l'arrondissement mitotique et l'activité d'HDAC6 par

immunobuvardage de type « Western », les drogues suivantes ont été ajoutées aux cellules qui ont été synchronisées en mitose par un double blocage à la thymidine, pendant 4 à 8 heures lors la seconde période de relâche avant la fixation cellulaire ou l'extraction protéique: tubacine, 5 µM ou CK666, 40 µM.

5.3. Transfection et siARN.

Pour les expériences de déplétion, les cellules HeLa et les cellules HeLa-RFP-H2B ont été transfectées pendant 16 h avec des siARNs duplex à 50 nM dans du tampon de transfection de calcium-phosphate (MgCl₂ 125 mM, NaCl 140 mM, HEPES 25 mM, Na₂HPO₄ 0,75 mM). Pour les cellules HeLa-Flp-in-Trex et les cellules HELA PARENTALES CCL2, le réactif Lipofectamine RNAimax (Invitrogen) a été utilisé en suivant les instructions du fabricant. L'efficacité de la déplétion a été analysée par immunobuvardage de type « Western ». Les analyses biochimiques, les expériences d'immunofluorescence ou de microscopie en cellules vivantes ont été commencées de 24 à 48 h après la transfection des siARN.

Les siRNA duplex sont basés sur les séquences humaines et ont été achetés auprès de Qiagen (siARN de qualité HPP, siCtl : Allstars Negative Control) ou de Thermo Fisher Scientific (qualité A4 standard). Les séquences des brins sens sont les suivantes:

	Nom du siARN	Séquences (brins sens)	Provenance
Contrôle	siCtl	5'-CAGGGTATCGACGATTACAAA-3'	Qiagen
BAG3	siBAG3#1	5'-CGAAGAGTATTTGACCAAA-3'	Qiagen
	siBAG3#2	5'-GCAAAGAGGTGGATTCTAA-3'	Thermo Fisher Scientific
	siBAG3#3	5'-GATGTGTGCTTTAGGGAAT-3'	Thermo Fisher Scientific
	siBAG3#4	5'-TAACTTGGGTGGAGGCAA-3'	Thermo Fisher Scientific
	siBAG3#5	5' -CTGACTTTAGAGAGAGTAATT- 3'	Thermo Fisher Scientific
HSPB8	siHSPB8#1	5'-CAGATAGGCTAGTGGTATT-3'	Thermo Fisher Scientific
	siHSPB8#2	5'-GCAGTGAATGCAAGGGTTATT-3'	Thermo Fisher Scientific
P62/SQSTM1	sip62#1	5'- GGAAATGGGTCCACCAGGATT 3'	Thermo Fisher Scientific
	sip62#2	5'- AGACCAAGAAGACTATGACAT -3'	Thermo Fisher Scientific
HDAC6	siHDAC6#1	5' -GGTAAAGAAGAAAGGCAAATT- 3'	Thermo Fisher Scientific
	siHDAC6#2	5' -GGGACAACATGGAGGAGGATT- 3'	Thermo Fisher Scientific

Pour induire la surexpression de cortactine et de HDAC6 pour les expériences de PLA, des HELA PARENTALES CCL2 ont été synchronisées par un double blocage à la thymidine et transfectées durant la seconde période de blocage à la thymidine en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Seize heures après la transfection les cellules ont été lavées

avec du PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.47 mM KH₂PO₄) et relâchées dans du milieu frais durant 8 à 9 h avant d'être fixées.

Pour induire la surexpression des mutants 3X-FLAG de cortactine pour les expériences de restauration de l'arrondissement mitotique et de la structure ectopique enrichie en F-actine entourant le fuseau mitotique, des cellules HeLa-RFP-H2B synchronisées en mitose par un double blocage à la thymidine ont été transfectées durant la première période de relâche en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) en suivant les instructions du fabricant. Huit heures après la transfection le milieu des cellules a été changé et 2 mM de thymidine y ont été ajoutés.

Adénofection et induction.

Le protocole d'« adénofection », décrit dans Fuchs et al, 2016, a été à l'origine développé pour réaliser les expériences de déplétion-restauration de phénotypes qui permet de suivre en temps réel la dynamique du fuseau mitotique et de l'actine, par l'introduction de faibles taux (non interférants) de RFP- α -tubuline (BacMam ; C10614, Life Technologies) ou de l'adénovirus Ad-LifeAct-TagGFP2 (60121, IBIDI) compatibles avec l'imagerie de cellules vivantes. Ce protocole a ensuite été utilisé pour réaliser d'autres types d'expériences (immunofluorescences, immunoprécipitations). Brièvement, des cellules HeLa-RFP-H2B ont été infectées soit par les adénovirus Ad-BAG3-GFP à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 à 2 unités formant une plaque par cellule (pfu/cellule ; expériences d'immunoprécipitations et d'immunofluorescences (arrondissement et enrichissement périnucléaire; chapitre 3 et 4); soit avec le réactifs BacMam 2.0 à 4 pfu/cellule et l'Ad-LifeAct-GFP à 1 pfu (analyse du mouvement de nuage sous-corticale d'actine et de la dynamique du fuseau mitotique, chapitre 4); soit infectées conjointement avec Ad-BAG3-GFP et le réactif BacMam 2.0 dans du milieu α -MEM minus (analyse de la dynamique du fuseau mitotique dans les expériences de déplétion-restauration de phénotypes avec les phospho-mutants de BAG3, chapitre 3). Puis les cellules ont été transfectées (calcium-phosphate) avec les siARN spécifiques et ont été synchronisées avec 2 mM de thymidine (16 h). Les cellules ont été lavées trois fois avec de l'HEPES (KCl 6,7 mM, NaCl 150 mM, HEPES 10 mM, pH 7,3) et ont été relâchées dans du milieu α -MEM (minus ou classique) frais pendant 8 h avant l'ajout de RO3306 (8 μ M) pendant 18h pour les expériences d'enrichissement périnucléaire de BAG3, l'ajout de 2 mM de thymidine pendant 16 h pour les expériences de déplétion-restauration de phénotypes ou de nocodazole (200 à 400 ng/ml, 16 h) pour les expériences d'immunoprécipitation. L'imagerie des cellules vivantes a été réalisée 8 h après la seconde relâche du blocage à la thymidine dans du milieu α -MEM sans PhenolRed.

Pour induire l'expression des constructions BAG3-GFP dans les lignées stables inductibles HeLa-Flp-in TRex, pour les expériences de déplétion-restauration des « *p62 bodies* » mitotiques (chapitre 3), 1 ng/ml de doxycycline a été ajoutés aux cellules pendant 16 h de manière concomitante avec la transfection des siARN et la synchronisation des cellules avec la thymidine (2 mM). Les cellules ont été lavées 3 fois puis relâchées pendant 8 h dans du milieu frais α -MEM minus avant l'ajout de 2 mM de thymidine (16 h). Les cellules ont été fixées 48 h après la transfection et l'induction. Pour les expériences d'immunoprécipitations (chapitre 3), 10 ng/ml de doxycycline a été ajoutés aux cellules et après les 4h d'incubation, le milieu des cellules a été changé et remplacé par du milieu α -MEM frais. Quatre heures plus tard, 100 ng/ml de nocodazole (16 h) a été ajouté pour synchroniser les cellules en mitose. Les cellules ont été récupérées par agitation mécanique 24 h après l'induction.

5.4. Immunoprécipitation et immunobuvardage de type « Western ».

Les cellules mitotiques synchronisées au nocodazole ont récupérées par agitation mécanique et lavées dans du PBS froid et ont été lysées par 3 cycles de congélation/décongélation dans 4 volumes de tampon de lyse (20 mM TRIS-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% IGEPAL, 1 mM NaVO₄, 10 mM NaF, 40 mM β -glycérophosphate, 1X Complete (Roche), 1 mM DTT). Les cellules mitotiques sont récupérées par agitation mécanique. Des billes magnétiques recouvertes de protéine A (Dynabeads protein A, Life Technologies) préalablement équilibrées dans le tampon de lyse ont été incubées 30 min avec un anticorps spécifique à 4°C sous agitation. Les billes magnétiques couplées à l'anticorps sont alors récupérées et des quantités égales de surnageants, provenant des extraits cellulaires qui ont été centrifugés à 15 000 g pendant 15 min à 4°C, sont transférés dans un tube propre contenant les billes magnétiques. Après incubation pendant 60 minutes à 4°C sous agitation douce, les immuno-complexes ont été recueillis en utilisant un support magnétique et lavés trois fois dans du tampon de lyse. Des quantités égales de complexes immuns ont été chargées sur SDS-PAGE et analysées par immunobuvardage de type « Western ».

Pour les immunobuvardage de type « Western », les cellules ont été lysées dans un tampon SDS (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.3% SDS, 10% glycérol, 5% β -mercaptoéthanol, 0.05% bleu de bromophénol, 1 mM phénylméthylsulfonylfluoride) et des quantités équivalentes de protéines provenant des lysats cellulaires totaux ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE de gels à 7,5 % d'acrylamide puis transférés sur membranes de nitrocellulose. Il est à noter que l'acrylamide utilisé à un ratio BIS-Tris modifié (29.2 :0.8 au lieu de 29 :1).

L'immunobuvardage a été effectué selon le protocole décrit par Champagne et al., 2004. La concentration protéique des échantillons a été déterminée à l'aide du kit « DC protein assay » (Laboratoires Bio-Rad) et l'analyse densitométrique a été effectuée à partir d'images acquises avec l'appareil FluorS MAX MultiImager contrôlé par le logiciel QuantityOne version 4.5.0 (Laboratoires Bio-Rad).

5.5. Anticorps et produits chimiques.

Les anticorps suivants ont été utilisés pour les expériences:

Protéines	Références	Compagnies	Utilisations
α -actinine	sc-166524	Santa Cruz Biotechnology	WB
α -tubuline (lapin)	ab18251	Abcam	IF
α -tubuline (souris)	T5168	Sigma Aldrich	IF
BAG3	LP11 (lapin)	Fuchs et al,2015	IP
p-S386-BAG3	pS386	Laboratoire Lavoie	WB
p-T285-BAG3	pT285	Laboratoire Lavoie	WB
β -actine	A5441	Sigma-Aldrich	WB
CDK1	sc- 954	Santa Cruz Biotechnology	WB
pY15-CDK1	#9111S	Cell Signaling Technologies	WB
CEP170	#413200	Invitrogen	WB
cortactine	ab33333	Abcam	WB+IF+PLA
acK309-cortactine	ABT1378	Millipore	WB
cycline B1	sc-245	Santa Cruz Biotechnology	WB
émerine	sc-15378	Santa Cruz Biotechnology	WB
filamine A	ab76289	Abcam	WB
FLAG	F3165	Sigma-Aldrich	IF
GAPDH	Clone 6C5 Fitzgerald #10R-G109a	Millipore	WB
GFP	A-11120	Molecular Probes/Thermo Fisher	IP
GFP	sc-9996	Santa Cruz Biotechnology	WB+IF
HDAC6	#7612	Cell Signaling Technologies	WB
HDAC6	sc-11420	Santa Cruz Biotechnology	WB+IF+PLA
HSP70	SPA810	StressGene	WB
HSPB8	#25 (lapin)	Carra et al., 2008	IP
HRP lapin	#111-055-003	Jackson ImmunoResearch.	WB
HRP souris	#115-035-146	Jackson ImmunoResearch.	WB
ac-K total	#9814	Cell Signaling Technologies	WB
lamine B1	Ab16048	Abcam	IF
myosine II (MYH9)	PRB-440P	Cedarlane Laboratories	WB
p62/SQSTM1 (lapin)	#5114	Cell Signaling Technologies	WB
p62/SQSTM1 (lapin)	sc-25575	Santa Cruz Biotechnology	WB+IF
p62/SQSTM1 (souris)	sc-28359	Santa Cruz Biotechnology	WB+IF

pT269-S272-p62/SQSTM1	#13121	Cell Signaling Technologies	WB+IF
pS403-p62/SQSTM2	#14354	Cell Signaling Technologies	IF
vinculine	V9131	Sigma-Aldrich	WB
Ub-K63	#05-1308	Millipore	WB+IF

Préparation de l'anticorps anti-phospho-S386-BAG3: des antigènes pour l'immunisation de lapin ont été préparés avec le phospho-peptide CPSAVPSPSPKSVA (pS386-BAG3) réticulés sur l'hémocyanine de patelle (gastéropodes de la famille des Fissurellidae) avec du diméthylformamide. Le sérum a été purifié par affinité en utilisant d'abord une colonne phospho-peptidique réticulée avec le kit d'immobilisation Sulfolink pour peptides (Pierce # 44999), puis des anticorps non-phospho-peptidiques ont été absorbés sur une colonne non-phospho-peptidique. Les IgG anti-phospho-peptide ont été recueillis dans des éluats, concentrés et maintenus à -20 ° C dans du glycérol à 50% dans du PBS.

Les produits chimiques suivants ont été utilisés pour les expériences:

Produits	Références	Compagnies
Alexa-Fluor® 488 Phalloïdine	A12379	Molecular Probes/Thermo Fisher
Alexa-Fluor® Texas Red-X Phalloïdine	T-7471	Molecular Probes/Thermo Fisher
BI2536	2CT/09	JS Research Chemicals Trading
Blasticidine	#203350	Calbiochem
CK666	SML0006	Sigma-Aldrich
Doxycycline	D9891	Millipore Sigma
Fibronectine	F1141	Sigma-Aldrich
Hoechst Bisbenzimidazole H 33342	B2261	Sigma-Aldrich
Hygromycin B	HD0230	Biobasic Canada
MG132 (Z-leu-leu-leu-al)	C2211	Millipore Sigma
MLN8237	#1028486-01-2	Cedarlane
Nocodazole	#487928	Calbiochem
Poly-L-Lysine	P1399	Sigma-Aldrich
Purvalanol A	P4484	Sigma-Aldrich
RO3306	SML0569	Sigma-Aldrich
Thymidine	T9250	Sigma-Aldrich
Tubacine	S2239	Selleckchem

5.6. Immunofluorescences et PLA (« proximity ligation assay »).

Pour les expériences d'immunofluorescences, les cellules ont été fixées soit avec 4% de formaldéhyde ou paraformaldéhyde dans 0,2% de Triton X-100, 20 mM Pipes, pH 6,8, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 8,0, pendant 10 min à température pièce (MIBS, PLA), soit avec 4% de

paraformaldéhyde pendant 20 min à température pièce (arrondissement, enrichissement périnucléaire de BAG3 et HDAC6).

Les spécimens ont été traités pour l'immunofluorescence comme décrit dans Lavoie et al., 2000, en utilisant les anticorps primaires indiqués et les anticorps secondaires Alexa Fluor de chèvre anti-lapin ou anti-souris. L'ADN a été marqué avec le Hoechst et la F-actine a été marquée avec la phalloïdine Alexa Fluor (Molecular Probes/Thermo Fisher Scientific, Ottawa, On. CA).

Pour les essais de PLA, les échantillons ont été incubés avec des anticorps secondaires fournis par le kit *in situ* Duolink (Invitrogen, DUO92002-100RXN; anti-mouse minus #82004; anti-rabbit plus #82002) durant 1 h à 37 °C dans du PBS 1 % lait. Les spécimens ont été lavés trois fois pendant 5 minutes dans du tampon A (Tris 0,001 M, NaCl 0,15 M, 0,05% de Tween 20) et incubés avec la ligase (Invitrogen, # 82027) à 0,025 U/μl dans un tampon de ligation (# 82009) fourni par le Kit de réactifs de détection rouge (Invitrogen, DUO92008-100RXN) pendant 30 minutes à 37 °C. Après trois lavages pendant 2 minutes dans le tampon A, les échantillons ont été incubés avec la polymérase (# 82028) à 0,1 U/μl dans du tampon rouge d'amplification (# 82011) pendant 90 minutes à 37 °C. Enfin, les échantillons ont été lavés trois fois dans du tampon B (Tris 0,2 M, NaCl 0,1 M) pendant 10 min puis lavés deux fois dans le tampon B 0,001X. Le montage des lamelles de verre a été effectué à l'aide du milieu de montage fourni par le kit.

5.7. Microscopie.

Les phénotypes ont été observés en routine par au moins deux investigateurs indépendants par inspection visuelle d'échantillons fixés et ont été quantifiés à l'aveugle au traitement, en utilisant un système AxioObserver Z1 utilisant un objectif 40x Plan-Neofluoar 0.6 NA ou 60x 1,25 NA et une caméra CCD AxiocamMRm contrôlée par le logiciel Zen (Carl Zeiss). Les images d'épifluorescence ont été acquises avec le même système de microscope. La microscopie confocale des cellules fixées a été réalisée avec un microscope confocal FV1000 équipé d'un objectif Plan Apo 60X à huile 1.42 NA (Olympus, Hauppauge, NY, USA) ou avec un appareil Spinning Disc Confocal Perkin Elmer UltraVIEW (60x huile 1,4 NA), équipé d'une caméra à couplage de charge refroidie par EMCCD à -50 °C (Hamamatsu Photonics KK) et piloté par la version 6.01 du logiciel Volocity.

Les défauts d'arrondissement mitotique ont été estimés par inspection visuelle comme suit : cellules mitotiques partiellement arrondies ou plates, et ont été estimées à partir d'expériences indépendantes. Seules les cellules en métaphase ont été considérées et les phases mitotiques ont été déterminées grâce à la détection du fuseau mitotique et de l'ADN.

L'indice mitotique indique le pourcentage de cellules dans les différentes phases mitotiques au sein une population de cellules (en général 200 cellules sont analysées pour chaque condition de chaque expériences). Les phases mitotiques ont été estimées par inspection visuelle des cellules à partir d'expériences indépendantes et ont été déterminées grâce à la détection du fuseau mitotique et de l'ADN.

L'enrichissement périnucléaire de BAG3 a été estimé par inspection visuelle et a été quantifié de façon qualitative à partir de cellule individuelle en phase G2/M provenant d'expériences indépendantes.

Le nombre de **spots PLA** ont été quantifiés en utilisant l'outil "Findobject" du logiciel Volocity. Un seuil minimal de volume d'objets de $0,1 \mu\text{m}^3$ a été calibré et les cellules ont été considérées selon un seuil d'intensité moyenne de GFP-HDAC6 compris entre 50 et 250.

Imagerie en temps réel.

La microscopie confocale des cellules vivantes a été réalisée avec un appareil Spinning Disc Confocal Perkin Elmer UltraVIEW 40x 0,75 NA, équipé d'une caméra à couplage de charge refroidie par EMCCD à -50°C (Hamamatsu Photonics KK) et piloté par la version 6.01 du logiciel Volocity. Le système était équipé d'une chambre humidifiée à 5% CO₂ et thermorégulée. Pour ces expériences, les cellules HeLa-RFP-H2B ont étéensemencées sur des pétris à fond de verre recouverts de fibronectine (MatTek Corp.). Pour l'imagerie en temps réel, les images ont été acquises à des intervalles de 90 secondes pendant une période de 75 minutes commençant 48 heures après la transfection des siARN. Le logiciel Volocity 6.01 (technologies de Quorum) a été employé pour le traitement sur des images entières avant le recadrage pour accentuer le point principal de l'image. Le traitement s'est limité à la soustraction de l'arrière-plan et à l'ajustement de la luminosité/du contraste.

Les phénotypes de défauts mitotiques ont été estimés par inspection visuelle des séquences d'images suivies dans le temps. Le nombre de cellules présentant ou non des défauts ont été estimées à partir de l'analyse en cellule individuelle, dans chaque condition, provenant d'expériences indépendantes (le nombre de cellules et d'expériences ont été reportés dans chaque figure). Pour les analyses du **positionnement du fuseau mitotique**, les cellules considérées en défauts présentaient des rotations du fuseau mitotiques (ou mauvais positionnement) et/ou des retard de la progression des cellules en prométa-métaphase. Pour les analyses des **phénotypes du mouvement et de la dynamique du nuage sous-cortical**, les cellules présentant un mouvement rotatif unidirectionnel ont été catégorisées dans « polarisé » ; les cellules qui présentaient des changements dans la direction du mouvement (non polarisés) ont été catégorisées comme « erratique » et considérées en défauts ; lorsque le nuage était immobile ou absent, ce phénotype a été catégorisé comme « absent ».

Analyses statistiques.

Pour l'analyse statistique des mitoses défectueuses (positionnement du fuseau mitotique, l'arrondissement des cellules, mouvement du nuage sous-cortical), de l'enrichissement périnucléaire de BAG3-GFP_WT ou mutants ou de l'indice mitotique, les données provenant d'au moins trois expériences indépendantes ont été analysées en utilisant le test statistique exact de Fischer. Ce test est un test non paramétrique utilisé pour des échantillons de petite taille avec des variables nominales/catégoriques. Le logiciel statistique Prism 6.0 (GraphPad Software) a été utilisé pour effectuer les tests statistiques.

Pour l'analyse de comparaison du nombre de spots de PLA par cellule, les données provenant d'au moins trois expériences indépendantes ont été analysées en utilisant le test statistique Kruskal-Wallis, qui est un test non paramétrique qui compare plus de 2 groupes non appariés de variables ordinales ou numériques, combiné au test de comparaison multiple de Dunn (test non paramétrique effectué après un Kruskal Wallis).

Purification de la protéine BAG3 recombinante et essai kinase in vitro avec CDK1/cycline B1.

L'ADNc codant pour BAG3 humain (humain de longueur complète) a été cloné en phase avec GST dans le vecteur pGEX-4T3. Les protéines ont été exprimées dans BL21codon + (RIL) (Stratagene), lysées par sonication dans du PBS additionné de 0,1% de Triton X-100, Complete (Roche) et de 1

mM DTT, purifiées avec du Glutathione-Sepharose 4B (Pharmacia), dialysées et concentrées dans du PBS. Différentes concentrations d'histone H1 (H1917 de Sigma-Aldrich), GST-BAG3 ou GST seule ont été incubées avec 3,5 unités de CDK1 / cycline B1 (P6020S, New England Biolabs) dans 20 µl de TRIS-HCl 50 mM, pH 7,4, 200 µM [γ -³²P]-ATP (3 µCi / tube, de Perkin Elmer), 10 mM de MgCl₂ et 2 mM de DTT pendant 30 minutes à 30 ° C. Les protéines ont été séparées sur SDS-PAGE, colorées avec du bleu de Coomassie R250, et la radioactivité incorporée dans les protéines a été révélée à l'aide d'un système d'imagerie (modèle FLA-5100, Fujifilm Life Science). Pour l'essai kinase *in vitro* « à froid » (sans radioactivité), 1 µg de GST-BAG3 ou GST seul ont été incubés avec 0, 3 ou 9 unités de CDK1 / cyclineB1 (P6020S, New England Biolabs) dans 20 µl de TRIS-HCl 15 mM pH 7,4, 250 µM ATP, 12,5 mM de MgCl₂ et 0,6 mM de DTT pendant 45 minutes à 30 ° C.

Chapitre 6: Discussion générale.

Sur la base de l'hypothèse que la phosphorylation mitotique de BAG3 constituerait l'élément régulateur de son action mitotique effectuée potentiellement en collaboration avec ses partenaires HSPB8, p62 et HDAC6, les travaux de cette thèse avaient pour but de définir l'importance fonctionnelle de cette phosphorylation ainsi que de son association avec ses partenaires d'interaction mitotiques.

Les résultats originaux obtenus ont mis en évidence que BAG3 est phosphorylée sur les résidus T285 et S386 par la kinase majeure de la mitose CDK1, soulignant l'importance fonctionnelle de la phosphorylation de ces sites. Ils suggèrent également que ces sites de phosphorylation lui conféreraient une activité distincte sur le remodelage des structures mitotiques. De surcroît, les analyses effectuées suggèrent que BAG3 pourrait être phosphorylée dès la phase G2/M sur le résidu S195, ce qui modulerait sa localisation. En outre, nous avons découvert que la formation du complexe tertiaire BAG3-HSPB8-p62 d'une part, faciliterait l'assemblage de nouvelles structures mitotiques que nous avons identifiées comme des « *p62 bodies* » et d'autre part, contribueraient à la modulation de l'activité de la déacétylase HDAC6 sur sa cible cortactine.

Cette discussion s'articulera autour de deux hypothèses qui découlent de ces travaux : l'une concernant le rôle de la phosphorylation différentielle de BAG3 dans la modulation de ses fonctions pendant la phase G2/M et la mitose (6.1) ; l'autre portant sur le rôle de ces phosphorylations dans la régulation de la fonction de BAG3 en tant que plateforme signalétique (6.2). Enfin, nous discuterons des questions qu'ont soulevées nos travaux, de quelques modèles plus hypothétiques et des perspectives associées (6.3).

6.1. La phosphorylation site-spécifique de BAG3 : un élément clé de sa régulation fonctionnelle au cours du cycle cellulaire.

Dans la section 1.3.2.4, nous avons mentionné que BAG3 pourrait être une plateforme d'interaction importante, sur la base du nombre d'interacteurs différents de BAG3 déjà identifiés (Chen, Kolahi, et Mofrad 2009; Hein et al. 2015), ce qui permettrait entre autres le couplage des systèmes chaperons HSP70 (fonction avérée montré par Colvin et al, 2014) et HSPB8 (fonction supposée, entre autres par les évidences dans cette étude) à différentes voies de signalisation cellulaires. Par ailleurs, nous avons aussi évoqué la possibilité que la phosphorylation de BAG3 pourrait jouer un rôle crucial dans l'assemblage de cette plateforme. Les résultats présentés dans cette thèse soutiennent ainsi cette idée et apportent des évidences qui laissent croire que la phosphorylation de BAG3, tout comme son association avec les nouveaux partenaires identifiés incluant CDK1, HDAC6 et cortactine, sont régulées d'une manière qui dépend du cycle cellulaire et en partie du moins, de l'activité de CDK1. Par ailleurs, cette étude est la première à notre connaissance, à analyser les interactions entre BAG3 et ses partenaires au cours du cycle cellulaire. Ces partenariats différentiels selon les phases du cycle ainsi découverts nous permettent de spéculer que la phosphorylation de BAG3 à l'entrée des cellules en mitose, notamment sur T285 et S386, dicterait la nature de ses interactions dans le temps et l'espace. Par exemple, la phosphorylation à l'entrée des cellules en mitose pourrait favoriser son association avec les protéines du cytosquelette d'actine (actine, myosine, filamine A, α -actinine et cortactine) et diminuer son affinité pour des protéines associées au centrosome et/ou à l'enveloppe nucléaire (CEP170, émerine). En outre, nous avons montré qu'à la transition G2/M, BAG3 s'accumule en périphérie du noyau, d'une manière dépendante de HSPB8 (Fuchs et al. 2015). Les résultats présentés au chapitre 3 suggèrent que la phosphorylation de BAG3 sur d'autres sites, entre autres la S195, pourrait moduler ce recrutement périnucléaire. Cette phosphorylation pourrait d'ailleurs dépendre de la kinase Aurora A. Ainsi, l'enrichissement de BAG3 dans cette région pourrait moduler son association avec CEP170, émerine et/ou HDAC6. Afin de tester ce modèle, il sera important de valider l'impact de la phosphorylation site-spécifique de BAG3 par des essais de co-immunoprécipitations avec les différents mutants non-phosphorylables de BAG3.

Sur la base des résultats présentés dans cette thèse, on peut donc suggérer que la phosphorylation site-spécifique de BAG3 est responsable en partie de son action différentielle dans les cellules, en modulant sa localisation et/ou son association avec ses partenaires d'interaction. Nous discuterons dans cette section des modèles possibles.

6.1.1. Rôle potentiel de la phosphorylation sur S195 dans le recrutement de BAG3 dans la région périnucléaire pendant la phase G2/M.

Basés sur les résultats présentés dans cette thèse, sur des évidences préliminaires obtenues au laboratoire et sur des données de la littérature, nous discuterons ici de l'éventuelle la modulation de la localisation de HDAC6 par BAG3 de façon dépendante de son enrichissement périnucléaire en phase G2 (6.1.1.1). Nous aborderons ensuite la possibilité que le recrutement périnucléaire de BAG3 facilite la phosphorylation sur ses sites mitotiques par CDK1-cycline B1 (6.1.1.2). Enfin, nous explorerons l'idée que la phosphorylation de BAG3 en phase G2 pourrait moduler la fonction chaperon de HSPB8 (6.1.1.3).

6.1.1.1. Modulation de la localisation de HDAC6 par BAG3 via la phosphorylation du résidu S195 ?

Pendant la phase G2/M, BAG3 semble exporter HDAC6 de la région périnucléaire et centrosomale au cytoplasme, ce qui coïncide avec une augmentation de leur association (chapitre 4). Ainsi, un modèle envisageable serait que la phosphorylation de BAG3 par Aurora A ou une autre kinase à définir, sur S195, pourrait promouvoir l'association de BAG3 à HDAC6 et son « déplacement » de la région périnucléaire en G2/M. Afin de vérifier cette hypothèse, la priorité serait de confirmer que le résidu S195 est phosphorylé en G2/M, en utilisant des anticorps phospho-spécifiques. Déterminer si ce résidu est ciblé par Aurora A pourrait se faire via une approche similaire à celle utilisée au chapitre 2. Ensuite, des immunoprécipitations de BAG3-GFP_WT versus S195A en G2/M seraient à réaliser ainsi qu'analyser la localisation de HDAC6 dans des cellules exprimant le mutant BAG3-GFP_S195A. L'impact de Aurora A sur l'association BAG3-HDAC6 et sur la localisation de HDAC6 pourrait être étudié, par exemple par une approche d'interférence à l'ARN ciblant Aurora A.

Ces résultats apporteraient des évidences que la fonction de BAG3 dans l'export de HDAC6 de la région périnucléaire vers le cytoplasme pendant la G2/M impliquerait sa phosphorylation sur un résidu spécifique et pourrait identifier la kinase impliquée. Néanmoins, le rôle de l'export de HDAC6 demeure énigmatique.

6.1.1.2. Initiation de la phosphorylation mitotique de BAG3 par CDK1-cycline B1 pendant la phase G2/M à la région périnucléaire et centrosomale ?

Puisque BAG3 est enrichie dans la région péri-centrosomale en phase G2/M et que l'activation de CDK1 serait initiée aux centrosomes à cette phase (De Souza, Ellem, et Gabrielli 2000), nous pensons qu'il serait possible que la phosphorylation de BAG3 par CDK1 soit initiée de cette manière. En outre, l'enrichissement péri-centrosomal de BAG3 (chapitre 3) semble coïncider avec une augmentation de son association à CDK1 pendant cette phase (résultats supplémentaires, annexe 2). De ce fait, il est envisageable que le recrutement périnucléaire de BAG3 juste avant l'entrée des cellules en mitose puisse favoriser sa phosphorylation par CDK1 et puisse alors « initier » les fonctions mitotiques de BAG3. En outre, un pic d'activation de CDK1-cycline B1 se produirait juste avant la NEBD (environ 10 minutes avant dans les cellules HeLa) et initierait la prophase (Gavet et Pines 2010). Par ailleurs, nos résultats suggèrent une implication du résidu S195 et de l'activité de Aurora A sur l'enrichissement périnucléaire de BAG3 en G2/M, sans omettre que nous avons également observé un impact partiel de l'inhibition d'Aurora A sur la phosphorylation des résidus T285 et S386 pendant la mitose (chapitre 2 et 3). Pour valider ce modèle, il serait nécessaire d'évaluer la phosphorylation des résidus T285 et S386 sur le mutant non phosphorylable S195A dans des extraits cellulaires mitotiques dans le but de déterminer si la phosphorylation de la S195 est initiatrice des événements de phosphorylation mitotique. Selon ce modèle, la phosphorylation de S195 serait le précurseur de la phosphorylation des sites de phosphorylation mitotique de BAG3.

6.1.1.3. Modulation de l'activité chaperon de HSPB8 dépendante de la phosphorylation sur le résidu S195 de BAG3 ?

Le résidu S195 de BAG3 est localisé à seulement 13 acides aminés en amont du second motif IPV, essentiel pour l'interaction à HSPB8. Pour rappel, un motif très semblable (IXI/V) est retrouvé au sein des HSPB, dont HSPB8 est dépourvue, pour favoriser leur oligomérisation, un processus qui leur confère leur activité chaperon, c'est-à-dire leur capacité à « séquestrer » des substrats protéiques (Mchaourab, Godar, et Stewart 2009). Le modèle prévalent est que la phosphorylation des HSPB induirait une dissociation des oligomères en dimères (Garrido et al. 2012). Or, les deux motifs IPV de BAG3 mimeraient l'interaction qui se produit normalement entre les motifs IXI/V présents dans les HSPB qui favorisent la formation d'un dimère de HSPB8 et qui sont nécessaires pour son activité chaperon (Fuchs et al. 2010; Carra et al. 2008). Il serait alors envisageable que la

phosphorylation de BAG3 puisse favoriser ou déstabiliser l'association avec HSPB8 pour moduler sa fonction chaperon. De ce fait, au vu de sa localisation sur la séquence de BAG3, le résidu S195 s'avère être un candidat intéressant. Dans ce sens, nous avons obtenu des résultats préliminaires qui suggèrent que la phosphorylation de S195 pourrait induire une diminution de l'association entre BAG3 à HSPB8 puisque le mutant BAG3_S195A semblerait interagir plus fortement avec HSPB8 (résultats préliminaires non présentés). Ceci signifierait que la phosphorylation sur S195 de BAG3 déstabilise l'association avec HSPB8. Ces résultats suggèrent possiblement, qu'à défaut de former des oligomères, HSPB8 s'associe à BAG3 et son activité chaperon pourrait alors être modulée à travers la phosphorylation de BAG3. Ceci serait en tout cas en corrélation avec le mode de régulation par phosphorylation des HSPB, suggérant que la modulation de la fonction commune des HSPB serait conservée malgré la particularité de HSPB8.

Curieusement, la liaison de BAG3 à HSPB8 et sa phosphorylation sur le résidu S195 semblent requises pour le recrutement périnucléaire de BAG3. Bien que des évidences supplémentaires doivent être obtenues, il est permis de penser que dans un premier temps, HSPB8 favoriserait la localisation de BAG3 dans la région périnucléaire (fig. 6.2). Dans un second temps, la phosphorylation sur S195 hypothétiquement par Aurora A entrainerait une diminution de l'association avec HSPB8, mais favoriserait possiblement par exemple l'association avec CEP170 et/ou émerine, ou comme mentionné précédemment avec HDAC6. Il est par contre important de tenir compte des résultats qui suggèrent que la stabilité de BAG3 dépend fortement de HSPB8 pendant la mitose. Ainsi, il apparaît qu'une dynamique complexe de l'état de phosphorylation de BAG3 pourrait contrôler les fonctions mitotiques du complexe chaperon formé de BAG3-HSPB8.

Ceci pourrait induire une rétention d'une proportion de BAG3 en périphérie du noyau, lui permettant alors d'interagir (a) avec HDAC6 pour faciliter son export dans le cytoplasme, dont le rôle reste à élucider, et (b) avec CDK1 ce qui initierait la phosphorylation mitotique de BAG3. Ceci permettrait de ce fait à BAG3 d'acquies ses fonctions mitotiques, via un changement de son réseau d'interaction protéique. Le prochain paragraphe explorera d'ailleurs les mécanismes potentiels qui réguleraient l'action mitotique différentielle de BAG3, entre autres via la modulation de ses interactions protéiques.

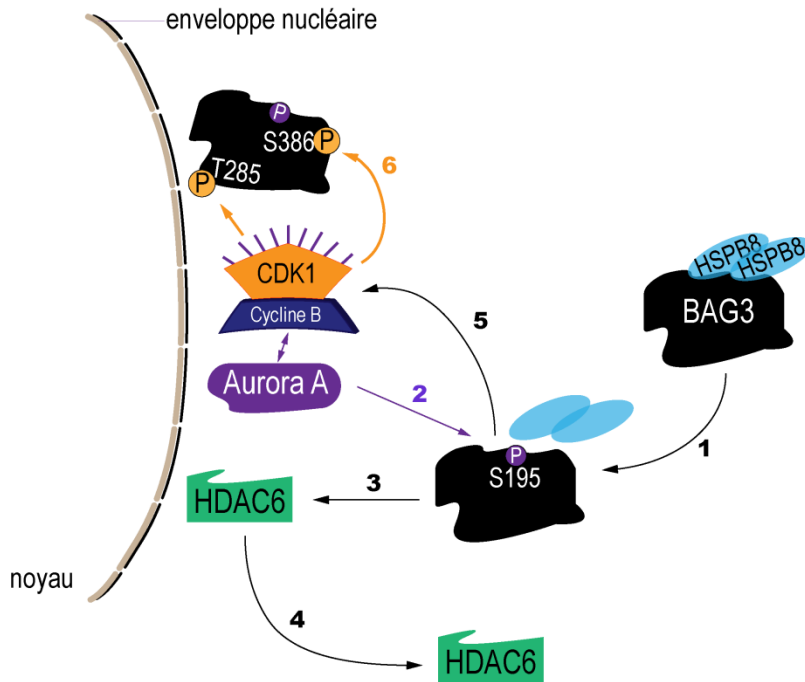


Figure 6.2 : Modèle hypothétique des fonctions du recrutement périnucléaire de BAG3 pendant la phase G2/M. (1) HSPB8 induit le recrutement de BAG3 en périphérie du noyau. (2) Cette localisation promeut potentiellement la phosphorylation de la S195 par Aurora A. (3) et (4) BAG3 favorise l'export de HDAC6 de la région périnucléaire dans le cytoplasme. (5) La présence de BAG3 dans la région centrosomale facilite son association à CDK1-cycline B1. (6) CDK1-cycline B1 phosphoryle BAG3 sur les résidus T285 et S386 pour potentiellement initier la phosphorylation mitotique de BAG3.

6.1.2. Les fonctions mitotiques différentielles de BAG3 : mécanismes potentiels de régulation par la phosphorylation sur T285 et S386.

Les résultats présentés dans les chapitres 2 et 3 ont permis de déterminer que la phosphorylation de BAG3 sur deux résidus différents, T285 et S386, lui confère des fonctions distinctes pendant la mitose. En effet, la phosphorylation des résidus S284 et T285 est requise pour faciliter l'arrondissement mitotique, l'orientation du fuseau mitotique et la formation des MIBS, tandis que la phosphorylation des résidus S385 et S386 est dispensable pour assurer le positionnement du fuseau mitotique. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que les événements de phosphorylation sur T285 et S386 seraient indépendants, corrélant avec l'observation d'une fonction différentielle. En effet, des résultats préliminaires indiquent que la mutation du résidu T285 n'affecte pas la phosphorylation du site S386 et vice-versa (chapitre 3).

Remarquablement, la phosphorylation sur S284 et T285 est dispensable pour la fonction de BAG3 dans la formation de l'agrésome dans des conditions d'inhibition du protéasome (chapitre 2, fig. S2.3). Dans ce contexte, la phosphorylation d'autres résidus : S136 et S173 semblent requis (Xu et al. 2013; Guilbert et al. 2018). Inversement, ces derniers sites de phosphorylation n'auraient pas d'incidence pour le bon positionnement du fuseau mitotique (résultats non présentés). Ces résultats

indiquent un effet « miroir » entre les sites de phosphorylations de BAG3 requis dans deux modèles différents. Ceci renforce la notion de l'importance de la phosphorylation de BAG3 comme mécanisme important dans la régulation de son action, qui permettrait aux cellules d'ajuster les fonctions de BAG3 et de ses chaperons associés, pour répondre de manière appropriée et dynamique aux besoins des cellules.

La phosphorylation d'une protéine a pour effet majeur un impact de sa conformation et conduit à deux conséquences bien caractérisées et inter-reliées: une modulation de la localisation de la protéine ainsi que de son association avec ses partenaires, comme discutée pour la potentielle phosphorylation de S195 pendant la phase G2/M. Ces propriétés des phosphorylations se révèlent particulièrement intéressantes dans notre modèle puisqu'une modulation par phosphorylation sur des sites spécifiques pourrait assurer une régulation spatio-temporelle de BAG3 et en conséquence de ses interacteurs. Ceci pourrait alors expliquer les phénotypes différentiels observés entre le mutant S284A-T285A et S385A-S386A.

Concernant la localisation mitotique de BAG3, dans notre étude de 2015, nous avons identifié que BAG3 est enrichie aux pôles du fuseau mitotique, donc aux centrosomes pendant la mitose (Fuchs et al, 2015). De manière surprenante, alors que sur des extraits cellulaires mitotiques totaux nous détectons uniquement la forme retardée sur gel de BAG3, nous avons constaté par des expériences d'isolation des centrosomes que seule une proportion de BAG3 hyperphosphorylée est retrouvée aux centrosomes, l'autre étant la forme « interphasique » (Fuchs et al, 2015). Ceci suggère potentiellement une modulation dynamique de la localisation de BAG3 aux centrosomes pendant la mitose. Puisque nos résultats suggèrent que la phosphorylation sur S195 pourrait potentiellement favoriser une rétention de BAG3 aux centrosomes *en G2/M*, et que peu de BAG3 hyperphosphorylée est détectée aux centrosomes *en mitose*, nous envisageons alors un modèle selon lequel l'hyperphosphorylation de BAG3 pourrait favoriser son exclusion centrosomale pendant la mitose. Pour vérifier ce point, deux choses pourraient être effectuées. La première serait d'évaluer la proportion de BAG3 sauvage versus les mutants non phosphorylables retrouvant aux centrosomes par des expériences d'isolation des centrosomes. La seconde serait de réaliser des expériences de FRAP ou de photoactivation avec BAG3 sauvage versus S195A, S284A-T285A et S385A-S386A pour évaluer si la phosphorylation confère une localisation dynamique à BAG3. Enfin, il serait crucial de comparer les niveaux de phosphoT285 versus phosphoS386 dans des expériences d'isolation des centrosomes, en utilisant les anticorps phospho-spécifiques, pour explorer la possibilité d'une modulation différentielle de la localisation de BAG3 selon le site

concerné. Observer une telle modulation pourrait constituer une piste d'investigation quant aux phénotypes différentiels observés entre le mutant S284A-T285A et S385A-S386A.

Concernant la modulation des interactions protéine-protéine par la phosphorylation de BAG3, il est à noter que le résidu S386 est situé dans le domaine PxxP, motif caractérisé par sa capacité à interagir avec des protéines à domaine SH3 (Kurochkina et Guha 2012). Il est donc envisageable que la phosphorylation de ce résidu engendre une stimulation ou une dissociation avec des protéines se liant via le domaine PxxP. Notamment, myosine II et cortactine, étant toutes deux des partenaires mitotiques de BAG3 (chapitre 3, fig. 3.8 ; chapitre 4, fig. 4.2), possèdent des domaines SH3 (Kurochkina et Guha 2012). De plus, myosine II a un rôle fondamental pour l'arrondissement mitotique des cellules (Maddox et Burrige 2003; Chanet et al. 2017), et nous avons montré que cortactine et les phosphorylations sur S386 sont requises pour ce processus (chapitre 3 et 4). D'ailleurs, allant dans le sens de l'éventualité, les co-immunoprécipitations obtenues dans le chapitre 4 suggèrent que le domaine PxxP de BAG3 est impliqué dans l'association mitotique de BAG3 avec cortactine. Ces observations permettent de supposer que la phosphorylation de BAG3 sur S386, pourrait réguler l'interaction avec ces protéines. Ainsi, une différence d'interaction entre le mutant S385A-S386A et cortactine et/ou myosine II pourrait fournir un lien entre le phénotype d'arrondissement et ces sites de phosphorylation. Le lien fonctionnel entre BAG3 et cortactine sera discuté dans la section 6.2. Ces constatations nous ont amené à spéculer que la phosphorylation de BAG3 sur S386 pourrait potentiellement influencer l'arrondissement mitotique sans perturber le positionnement du fuseau mitotique via la modulation de l'interaction avec myosine II pendant la mitose.

En effet myosine II semble être un partenaire de BAG3 pertinent pour expliquer les différences de phénotypes observés selon le site phosphorylé. En effet, en plus de son domaine SH3, d'être un partenaire mitotique de BAG3 et de présenter une fonction fondamentale dans l'arrondissement cellulaire mitotique, myosine II est un substrat de HDAC6 (Zhang et al. 2015). Notamment, cette étude suggère que la déacétylation de myosine II par HDAC6 diminue sa capacité d'association à l'actine. Or le recrutement de myosine II au cortex et la formation du cortex rigide d'actomyosine est essentielle pour le processus d'arrondissement (Matthews et al. 2012; Ramanathan et al. 2015). Remarquablement, l'inhibition de HDAC6 dans des cellules mitotiques a induit un bourgeonnement membranaire (ou « *blebbing* ») drastique (environ 80% des cellules présentent le défaut, résultats non présentés), suggérant de sévères défauts de la rigidité corticale. Bien qu'il ait aussi été reporté que cortactine est localisée au cortex (Théry et al. 2005), l'utilisation de l'inhibiteur d'Arp2/3 le

CK666, n'a pas induit de défauts de « *blebbing* » membranaire dans nos expériences (résultats non présentés). En corrélation avec ce résultat, il a été montré que l'inhibition d'Arp2/3 n'affecte pas la tension corticale mitotique (Ramanathan et al. 2015). Ceci pourrait suggérer que la cible plus probante de HDAC6 dans le « *blebbing* » membranaire serait myosine II. En ligne avec ces observations, bien que moins extrême que l'inhibition de HDAC6, la déplétion de BAG3 induit également du « *blebbing* » membranaire (~7% versus ~1% dans les cellules contrôles, Fuchs et al, 2015, annexe 1, fig. 7E). En plus d'évaluer l'association entre BAG3_S385A-S386A et myosine II, des essais de déplétion-restauration de phénotypes avec ce mutant pourraient être réalisés pour analyser l'impact des mutations sur le « *blebbing* » membranaire. Ceci permettrait de suggérer que la phosphorylation de BAG3 sur S385 et S386 module son action mitotique sur la rigidité corticale et l'arrondissement des cellules via la modulation de l'association avec myosine II.

Par ailleurs, l'association mitotique de BAG3 avec d'autres protéines du cytosquelette pourrait également être importante pour l'arrondissement mitotique comme par exemple α -actinine ou filamine A, qui collaborent pour réguler la rigidité du réseau d'actine (caractérisation *in vitro*; Esue, Tseng, et Wirtz 2009). D'ailleurs, α -actinine est localisée au cortex des cellules pendant la mitose et facilite la localisation de myosine II au cortex conduisant à une augmentation de la tension corticale (Fischer-Friedrich et al. 2016; Toyoda et al. 2017). Une analyse de l'association des mutants BAG3_S284A-T285A et BAG3_S385A-S386A avec α -actinine et filamine A pourrait être effectuée pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui sont orchestrés par la phosphorylation de BAG3 pendant la mitose.

Si une telle fonction de BAG3 fait intervenir une activité chaperon en association avec HSPB8, il est fort probable que les associations entre BAG3-HSPB8 et ses partenaires soient dynamiques. En ligne avec cette idée déjà, nos résultats suggèrent que la phosphorylation de BAG3 serait dynamique pendant la mitose. Ensuite, nous avons essayé d'obtenir des évidences quant à une modulation d'interactions entre les mutants non-phosphorylables de BAG3 et ses partenaires mitotiques, en vain actuellement. Curieusement, bien que nous soyons en mesure de détecter des variations d'associations entre BAG3 sauvage et les mutants non phosphorylables (S284A-T285A et S285A-S386A), un effet clair de ces mutants sur les partenaires demeure cependant énigmatique. En effet, avec le même partenaire, nous avons parfois détecté une augmentation de l'association, parfois une diminution. Il est à noter qu'en revanche le mutant phosphomimétique T285D semblerait avoir une tendance à augmenter les associations avec les partenaires mitotiques de BAG3. Plusieurs suppositions importantes découlent de ces constatations. Déjà, si la modulation

d'association aux partenaires de BAG3 dépend d'une dynamique de phosphorylation-déphosphorylation de la protéine, ceci peut expliquer pourquoi un mutant pour le résidu T285, qu'il soit non phosphorylable ou phosphomimétique, n'est pas fonctionnel. En l'occurrence, ceci pourrait signifier que BAG3 phosphorylée s'associerait à ses partenaires, et suivant sa déphosphorylation serait capable de les relarguer. Perturber cette dynamique d'association, dans un sens ou l'autre, induirait donc un dysfonctionnement de processus cellulaire impliqué, la protéine partenaire de BAG3 se retrouvant en surplus ou « séquestrée ». Remarquablement, un tel mode d'action potentiel est extrêmement semblable au mode d'action décrit de la famille des HSPB (section 1.2.1.2.2). L'ensemble de ces réflexions laissent croire qu'analyser l'association de BAG3 à ses partenaires mitotiques par des méthodes classiques comme des immunoprécipitations constitueront un challenge, et pourraient possiblement ne jamais se révéler concluantes. Des méthodes alternatives devront être testées : une approche *in vitro* par « *GST pull down* » par exemple pourrait peut-être permettre de distinguer plus facilement une modulation d'association. *In cellulo*, l'utilisation d'une technique comme le FRET (transfert d'énergie par résonance de fluorescence), pourrait nous permettre mesurer des différences dans les associations entre les mutants de BAG3 et ses partenaires mitotiques.

Globalement, nos résultats ont dévoilé « la partie émergée de l'iceberg » concernant la modulation par phosphorylation de BAG3 : il s'avère que la régulation de son mode d'action par sa phosphorylation est complexe, dépendante du cycle cellulaire et semble faire intervenir une multitude de facteurs incluant différentes kinases et partenaires d'interactions, et semble moduler sa localisation. Ces observations et modèles soutiennent ainsi la possibilité que BAG3 soit une plateforme d'interaction importante, dont la régulation serait dictée par sa phosphorylation. Dans la prochaine partie, sera abordé un modèle de mécanisme d'action de BAG3 selon lequel le co-chaperon favoriserait l'assemblage de complexes de signalisation qui ont pour fonction de faciliter le remodelage des structures cellulaires qui guident la mitose.

6.2. La phosphorylation de BAG3 dans la modulation d'une plateforme d'interaction couplant la déacétylase HDAC6 à son substrat cortactine pendant la mitose.

Sur la base de nos résultats couplés aux données de la littérature, on pourrait envisager deux modèles non exclusifs qui auraient pour point commun que la phosphorylation de BAG3 via la modulation de sa localisation et de ces interacteurs contribuerait à la régulation de l'activité d'enzymes, telle que HDAC6, en promouvant ou empêchant l'association avec ses substrats. La

fonction suggérée de BAG3 en tant que plateforme serait d'assurer le couplage des systèmes chaperons HSP70 et HSPB8 à différentes voies de signalisation cellulaires. Dans ces modèles proposés, BAG3 pourrait constituer une plateforme d'interaction qui couplerait les fonctions de HSPB8 avec des voies signalétiques associées au remodelage des structures cytosquelettiques cellulaires qui guident la mitose.

6.2.1. Le complexe BAG3-HSPB8 en tant que plateforme d'interaction pour moduler l'assemblage de complexe signalétique mitotique

Cette idée est soutenue par le fait que le complexe BAG3-HSPB8 facilite a) des interactions enzyme-substrat spécifiques, appuyé par la modulation d'association HDAC6-cortactine et b) potentiellement l'activité d'enzyme, en l'occurrence HDAC6, suggéré par le fait qu'une diminution de l'activité de la déacétylase corrige les défauts mitotiques induits par la déplétion du complexe chaperon (chapitre 4). De plus, nos résultats suggèrent que la modulation de l'association mitotique entre HDAC6 et cortactine par BAG3-HSPB8 régulerait les niveaux d'acétylation de cortactine, aboutissant à une modulation de la dynamique du nuage d'actine, possiblement via l'activité du complexe Arp2/3 (chapitre 4). Ce résultat devra être validé biochimiquement en évaluant directement les niveaux d'acétyl-cortactine suivant la déplétion de BAG3 ou HSPB8. Nos évidences permettent tout de même de spéculer que BAG3-HSPB8 modulerait négativement l'activité déacétylase de HDAC6 sur cortactine.

En corrélation avec ces observations, des données grandissantes dans la littérature suggèrent que BAG3 serait capable de moduler l'activité enzymatique de différentes protéines, entre autres en favorisant ou empêchant leur association avec leurs activateurs, leurs inhibiteurs, ou encore avec leurs substrats (Kassis et al. 2006; Iwasaki et al. 2007, 2010; Ammirante et al. 2010; Falco et al. 2012; Colvin et al. 2014; Yunoki et al. 2015; Kathage et al. 2017). Par exemple, BAG3 favorise l'association de la protéine kinase ERK et sa phosphatase DUSP6 résultant alors en la diminution de la phosphorylation de ERK et par conséquent, une baisse de son activité (Falco et al. 2012).

De manière importante, les résultats du chapitre 2 concernant la modulation de la phosphorylation de p62 et la kinase CDK1 ouvrent une hypothèse intéressante : le complexe BAG3-HSPB8 pourrait-il, au même titre que pour HDAC6-cortactine, constituer potentiellement une plateforme d'association/modulation pour CDK1-p62 ? Premièrement, l'association entre BAG3 et p62 est favorisée pendant la mitose, tout comme avec CDK1, de manière dépendante de l'association de

BAG3 à HSPB8 et son domaine PxxP de BAG3. Pour rappel, p62 est un substrat connu de la kinase (Linares et al. 2011). Deuxièmement, une diminution partielle de l'activité de CDK1 engendre une diminution du nombre de MIBS dans les cellules en métaphase, de la même manière que la déplétion de BAG3 ou HSPB8 (chapitre 2). Nous avons obtenu d'autres résultats préliminaires allant dans ce sens et présentés dans l'annexe 2. En effet, la déplétion de BAG3 dans des cellules mitotiques phénocopie une inhibition partielle de CDK1 sur l'arrondissement cellulaire et la progression des cellules en mitose (fig. A2.2). De plus, l'inhibition partielle de CDK1 dans des cellules mitotiques suivant la déplétion de BAG3 aggrave les défauts observés (fig. A2.2), suggérant que ces protéines pourraient agir dans la même voie signalétique. Il est à noter que de surcroît, la déplétion de p62 récapitule des défauts d'arrondissement observés suivant la déplétion de BAG3 ou HSPB8 (chapitre 4). Enfin, nous avons montré que la déplétion de BAG3 et HSPB8 induit une augmentation du signal phospho-Y15 de CDK1 (fig. A2.3, annexe 2), qui correspond à la phosphorylation inhibitrice de la kinase, dans les cellules mitotiques. En parallèle, nous avons observé une diminution de la phosphorylation mitotique de p62 sur les résidus ciblés par CDK1 suivant la déplétion de BAG3 ou HSPB8 (chapitre 2). L'ensemble de ces données suggère donc que le complexe BAG3-HSPB8 pourrait influencer l'activation de CDK1 sur p62, tout comme le complexe module l'activité de HDAC6 sur cortactine.

Par ailleurs, basé sur les résultats présentés dans l'annexe 2, il est permis d'envisager que BAG3-HSPB8 pourrait également moduler l'activité de CDK1 sur filamine A. Déjà, l'association entre BAG3 et filamine A est favorisée pendant la mitose (fig. 3.4 et A2.1) et cette ABP est également un substrat direct de CDK1 pendant la mitose (Cukier, Li, et Lee. 2007; Szeto et al. 2015). Il a été montré que la phosphorylation de filamine A par CDK1 diminue sa capacité de réticuler les filaments d'actine (Cukier, Li, et Lee. 2007), processus qui pourrait donc influencer la dynamique du cytosquelette d'actine pendant la mitose.

L'ensemble de ces résultats nous ont permis de spéculer que BAG3-HSPB8 pourrait moduler l'activité de la kinase CDK1 sur des substrats spécifiques comme p62 et filamine A pendant la mitose, ce qui contribuerait entre autres au processus d'arrondissement mitotique. Pour valider ce modèle, nous pourrions par exemple évaluer si la déplétion de BAG3 ou HSPB8 influence les niveaux de phosphorylation de filamine A. Bien que son rôle dans l'arrondissement des cellules mitotiques n'ait encore jamais été analysé à notre connaissance, il ne serait pas surprenant que la déplétion de filamine A ou une diminution de filamine A phosphorylée (potentiellement en conséquent de la diminution de l'activité CDK1 suivant la déplétion de BAG3 ou HSPB8) induisent

des problèmes d'arrondissement puisque cette ABP est reliée à la rigidité du cortex d'actine d'une part, et à la dynamique des adhésions focales, d'autre part (Esue, Tseng, et Wirtz 2009; Kim et McCulloch 2011; Liu et al. 2015; Sato et al. 2016). Aussi, l'obtention de mutants non phosphorylables de p62 et filamine A pour les résidus phosphorylés par CDK1 permettrait de vérifier si l'expression de ces mutants, suivant la déplétion des protéines endogènes, mimerait des phénotypes induits par la déplétion de BAG3 (défauts d'arrondissement par exemple). Pour consolider notre preuve de concept, il serait aussi requis d'obtenir des évidences quant à la modulation d'association entre CDK1-p62 ou CDK1-filamine A, ainsi qu'avec HDAC6-myosine II dans des cellules mitotiques déplétées en BAG3 ou HSPB8, comme obtenu pour l'association HDAC6-cortactine.

Le dogme initial de la relation moléculaire entre BAG3 et HSPB8 était que BAG3 est nécessaire à l'activité du chaperon HSPB8, puisque sa stabilité dépend de BAG3, mais l'inverse n'avait jamais été observé. En 2015, nous avons démontré que les fonctions mitotiques de BAG3 sont dépendantes de son association à HSPB8 constituant une première piste vers un changement de paradigme. Remarquablement, nous avons montré par la suite que HSPB8 stabilise les niveaux protéiques mitotiques de BAG3 (Varlet et al. 2017) et sa phosphorylation sur les résidus T285 et S386 (chapitre 2 et 3). Ces évidences mettent donc en avant que HSPB8 pourrait agir comme chaperon pour BAG3, crucial pour son action mitotique.

Outre l'association plus forte avec la déacétylase HDAC6 et la kinase CDK1 pendant la mitose (chapitre 2 et 4), BAG3 interagit aussi avec leurs substrats respectifs comme cortactine ou myosine II et p62 ou filamine A (chapitre 2, 3 et 4; annexe 2, fig. A2.1). De manière importante, des évidences suggèrent que HSPB8 stabilise l'association de BAG3 avec ces partenaires (chapitre 2 et 4, annexe 2). Ces observations permettent de proposer que la sélectivité d'interaction entre BAG3 et ses partenaires mitotiques est effectuée par HSPB8, que ce soit via la stabilisation de la phosphorylation de BAG3 ou potentiellement de manière directe. Par ailleurs, BAG3, manière dépendante de son domaine PxxP et de son association à HSP70, module l'activité de Src (Colvin et al. 2014). Cette étude fut la première à montrer un rôle de BAG3 en tant que plateforme de signalisation, en corrélation directe avec son rôle de co-chaperon de HSP70. En ligne avec ces constatations, un parallèle est très intéressant à souligner dans notre étude : de manière dépendante de son domaine PxxP et de son association à HSPB8, BAG3 module l'assemblage de complexes protéiques et l'activité de HDAC6. En outre, ce modèle corrèle avec l'idée développée

précédemment selon laquelle cortactine et myosine II, via leur domaine SH3, pourrait lier le domaine PxxP de BAG3.

De ce fait, les travaux de cette thèse apportent les premières évidences, à notre connaissance, que BAG3 pourrait être une plateforme d'interaction protéique qui couple l'activité chaperon de HSPB8 et des voies de signalisation. En effet, les résultats obtenus dans cette étude laissent entendre que la fonction chaperon de HSPB8 pendant la mitose confère au complexe BAG3-HSPB8 la capacité d'assembler ou désassembler des complexes de signalisation qui sont requis pour la progression mitotique.

En résumé, l'ensemble de ces observations permettent de postuler que BAG3 modulerait l'activité de HDAC6 et CDK1, potentiellement sur des cibles spécifiques, telles que cortactine ou p62. Une telle fonction serait possible grâce à l'assemblage de complexes de signalisation dont la sélectivité de substrats serait conférée par sa phosphorylation mitotique et la liaison à HSPB8. Il serait envisageable que cette sélectivité soit essentielle pour assurer un « triage » des interactions entre HDAC6 et CDK1 avec leurs innombrables cibles mitotiques (surtout concernant CDK1). Ceci serait en accord avec une des fonctionnalités classiques des co-chaperons qui est d'assurer le devenir des substrats des chaperons avec lesquels ils interagissent. Par ailleurs, ce processus pourrait répondre au besoin de la régulation spatio-temporelle fine qui a lieu en mitose pour remodeler les différentes structures cellulaires. Le fait que HSPB8 soit requise pour la localisation spécifique de BAG3 en G2/M amène une perspective intéressante : serait-il possible que HSPB8 module la localisation mitotique de BAG3 pour faciliter l'assemblage et/ou désassemblage spatio-temporels des complexes signalétiques ? Des analyses de la localisation de BAG3 suivant la déplétion de HSPB8 aiderait à évaluer cette hypothèse.

En outre, un autre processus dépendant du complexe BAG3-HSPB8 pendant la mitose pourrait avoir une fonction semblable sur la modulation d'activités enzymatiques via l'assemblage et désassemblage de complexes signalétiques contrôlés de manière spatio-temporels : la formation des MIBS de p62.

6.2.2. L'assemblage des « p62 bodies » mitotiques dépendant de la phosphorylation de BAG3 et de HSPB8 en tant que plateforme signalétique.

Les résultats présentés dans cette thèse et les études précédentes du laboratoire ont établi l'existence d'une relation fonctionnelle étroite et complexe entre BAG3, HSPB8 et p62, montrée par les niveaux protéiques et de phosphorylations interdépendants entre les membres du complexe (Fuchs et al. 2015; Varlet et al. 2017; Guilbert et al. 2018). D'ailleurs, l'entrée des cellules en mitose est marquée par l'augmentation de l'interaction entre BAG3 et p62 résultant en la formation d'un complexe tertiaire mitotique BAG3-HSPB8-p62 qui coïncide avec la formation des MIBS dépendants de p62. Remarquablement, leur formation est régulée par la phosphorylation de BAG3 sur les résidus T285 et S386 et l'activité de CDK1, qui cible BAG3 et p62. Ainsi, bien qu'une évidence directe par l'utilisation de mutants non-phosphorylables de p62 soit nécessaire pour confirmer notre hypothèse, il est permis de supposer que la phosphorylation de p62 par CDK1 faciliterait la formation des MIBS. Prenant en plus en considération que la modulation de l'activation de CDK1 semble impliquée en partie BAG3-HSPB8 (annexe 2), l'ensemble de ces données suggèrent une fonction centrale de la phosphorylation de ces protéines par CDK1 dans la formation des MIBS. Cette observation, associée au fait que ces MIBS contiennent des protéines poly-ubiquitinées sur K63, nous ont amené à considérer un modèle selon lequel ces structures pourraient potentiellement se former selon le principe de la séparation de phase (concept abordé dans chapitre 1).

En effet, il a été montré que la formation des « p62 bodies » dépend de la phosphorylation de p62, de la présence de longues chaînes d'ubiquitine, particulièrement sur K63, et de l'oligomérisation de p62 (Sun et al. 2018; Zaffagnini et al. 2018). Or, p62 est phosphorylée sur T269 et S272 par CDK1 pendant la mitose (Linares et al. 2011) et une inhibition partielle de la kinase conduit à une diminution du nombre de MIBS (chapitre 2). De surcroît, les MIBS sont associés à des protéines ubiquitinées sur K63. Enfin, des résultats préliminaires du laboratoire ont montré qu'un mutant de délétion du domaine PB1 de p62, essentiel pour son oligomérisation, n'est pas capable de former des MIBS suggérant que leur formation requiert l'oligomérisation de p62 (résultats non montrés). Les « p62 bodies » mitotiques identifiés dans notre étude partagent donc des caractéristiques communes avec les « p62 bodies » étudiés dans les publications de références (Sun et al. 2018; Zaffagnini et al. 2018).

Par ailleurs, comme mentionné dans le chapitre 1, les « *p62 bodies* » qui pourraient être assemblés par séparation de phase permettent la formation de complexes multimoléculaires, échangent des composants avec le milieu environnant, y compris ubiquitine, et subissent des événements de fusion et/ou de fission avec d'autres « *p62 bodies* ». Les résultats du chapitre 2 suggèrent que les MIBS sont des structures labiles et réversibles, montrées entre autres par l'évolution rapide de leur nombre et de leur taille selon la phase mitotique observée. De plus, des expériences préliminaires de microscopie en cellules vivantes suggèrent un tel mécanisme de fusion et de fission des MIBS de p62 (fig. 6.2 ; résultats obtenus en collaboration avec AA. Varlet et M. Fuchs).

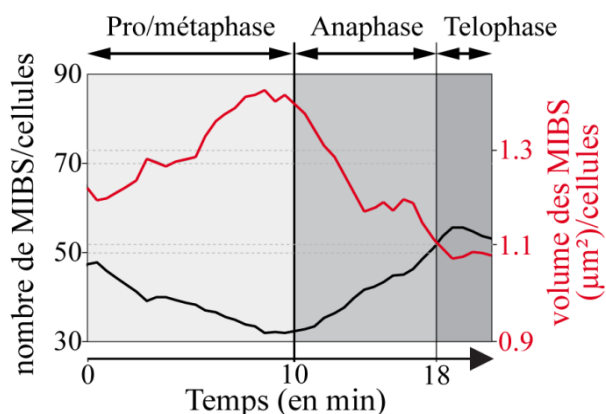


Figure 6.2 : Dynamique en temps réel du nombre et du volume des MIBS p62 pendant la progression mitotique. Le nombre et le volume de MIBS ont été quantifiés dans des cellules HeLa-Flp-in-T-Rex-p62-RFP mitotiques avec le logiciel Volocity à partir de séquence d'images confocales suivies dans le temps (n = 9 cellules). Le graphique montre une augmentation du nombre et du volume des MIBS par cellule de la prophase à la métaphase qui se désassemblent à la transition métaphase-anaphase.

Enfin, il a été suggéré qu'à l'intérieur d'un « *p62 body* », les molécules conserveraient en théorie leur conformation et leur activité (Sánchez-Martín et Komatsu 2018). Par conséquent, les « *p62 bodies* » pourraient servir de « plateformes », à partir desquelles des cascades de signalisation pourraient être activées (Sun et al., 2018). La découverte de cette nouvelle propriété laisse aussi croire que ce mécanisme pourrait être crucial pour la fonction signalétique des « *p62 bodies* » en tant que « centre » d'organisation de la signalisation en favorisant un échange rapide des composants. Par exemple, p62 organiserait une plate-forme moléculaire, en collaboration avec MEKK3, qui initie une cascade de kinases déclenchant l'activation de p38δ (Linares et al. 2015). De manière importante, un tel mécanisme met en jeu la phosphorylation de p62 sur T269 et S272 par mTORC1 et son domaine PB1, suggérant une implication de son oligomérisation. Cette propriété est particulièrement pertinente, corroborant avec plusieurs de nos observations, et soulèvent des pistes de réflexion et des modèles extrêmement intéressants dans le cadre de nos découvertes concernant les MIBS de p62.

Parallèlement à la formation des MIBS, nous avons observé que BAG3-HSPB8 régulerait les niveaux d'acétylation de cortactine via la modulation de l'activité de HDAC6. Ceci coïncide avec

une stimulation de l'association de cortactine à BAG3 pendant la mitose, de façon dépendante de HSPB8 et possiblement de p62 (chapitre 4). En outre, la déplétion de p62 récapitule les phénotypes mitotiques induits par la déplétion de BAG3 ou HSPB8, en lien avec une dérégulation de l'activité de HDAC6 sur cortactine (Fuchs et al. 2015, annexe 1 ; chapitre 4). Ceci suggère que l'association de p62 avec BAG3-HSPB8 participerait à la modulation de l'activité de HDAC6 sur cortactine, aboutissant à une modulation de l'activité du complexe Arp2/3 et donc du remodelage du cytosquelette d'actine. En corrélation avec cette idée, dans le contexte de la formation de l'agrésome, p62 module négativement l'activité de HDAC6 sur cortactine, influençant de ce fait le remodelage spatio-temporel du cytosquelette d'actine en périphérie de l'agrésome (Yan et al. 2013). Dans le contexte de la mitose, ce remodelage fait également appel à une modulation spatio-temporelle précise et rapide de la dynamique de l'actine, en particulier concernant le mouvement du nuage sous-cortical d'actine. En effet, son mouvement polarisé résulte de la dynamique de polymérisation-dépolymérisation des filaments d'actine sous le cortex de façon dépendante d'Arp2/3 (Mitsushima et al. 2010). Par ailleurs, l'activité de Arp2/3 semblerait à l'inverse être inhibée au cortex (Rosa et al. 2015), appuyant le fait que son activité est soumise à une modulation spatio-temporelle fine au sein des cellules mitotiques. L'ensemble de ces constatations nous ont conduit à penser que la modulation de l'activité de HDAC6 sur cortactine par BAG3-HSPB8 pendant la mitose pourrait s'effectuer à travers le recrutement de p62 et son assemblage au sein des MIBS. En ligne avec la possibilité que les « *p62 bodies* » échangent dynamiquement leurs composants avec leur environnement, il serait envisageable que la formation des MIBS facilite la séquestration réversible de cortactine et/ou de HDAC6. Un tel mécanisme serait idéal pour contrôler spatio-temporellement l'association de cortactine à HDAC6 pendant la mitose afin de contrôler localement la dynamique du cytosquelette d'actine.

Une hypothèse semble alors très attrayante : BAG3-HSPB8 pourraient orchestrer le ciblage de cortactine et/ou HDAC6 dans ces MIBS. Il paraît aussi envisageable que la phosphorylation de BAG3, potentiellement de façon dépendante du site, participerait au ciblage et/ou au triage des protéines dans les MIBS. L'ensemble de ce processus pourrait limiter donc l'association HDAC6-cortactine et contribuerait au mécanisme de modulation négative de l'activité de HDAC6 sur cortactine. Ensuite, une régulation spatio-temporelle de la « relâche » de HDAC6 et cortactine pourrait alors favoriser la polymérisation branchée d'actine uniquement aux sites requis. Ce mécanisme hypothétique pourrait faciliter la modulation de l'acétylation de cortactine favorisant une dynamique d'activation/inhibition spatio-temporelle d'Arp2/3 pour assurer la formation et la polarisation du nuage sous-cortical d'actine. À l'appui de cette idée, un mécanisme similaire a été

suggéré dans les cellules musculaires lisse où l'inhibition locale de mTORC1 serait contrôlée par BAG3 à travers la séquestration spatio-temporelle des protéines TSC (Kathage et al. 2017).

Néanmoins, un tel mécanisme demeure cependant hypothétique et demande d'être testée par différentes expériences. L'une d'entre elles serait de montrer que cortactine et/ou HDAC6 peuvent co-localiser avec les MIBS de p62. Néanmoins, l'échange rapide des composants des « *p62 bodies* » avec le cytoplasme pourrait fournir une complication de la détection des protéines localisées dans les MIBS. En l'occurrence, à l'heure actuelle la détection de ces protéines dans les MIBS s'est révélée infructueuse par les méthodes classiques d'immunofluorescences. Possiblement, l'utilisation d'une technique comme le FRAP pourrait nous permettre de détecter en temps réel une dynamique d'association entre cortactine et/ou HDAC6 avec des MIBS de p62.

Rappelons aussi que la distribution des fibres de rétractions, (Fuchs et al, 2015, annexe 1) qui contrôle la polarisation du nuage sous-cortical d'actine, qui lui-même guide l'orientation du fuseau mitotique (Fink et al. 2011), est perturbée suivant la déplétion de BAG3, HSPB8 et p62. Bien que les protéines composant les fibres de rétraction et les mécanismes moléculaires orchestrant la formation et la régulation de celles-ci demeurent encore peu connus, une étude suggère que cortactine est localisée aux fibres de rétractions (Théry et al. 2005). Des expériences de restauration des fibres de rétraction dans des cellules mitotiques déplétées en BAG3, HSPB8 ou p62 par l'inhibition d'HDAC6 avec la tubacine ou par expression des mutants d'acétylation de cortactine pourraient être effectuées afin de vérifier si la modulation de l'acétylation de la cortactine serait un mécanisme de régulation des fibres de rétraction. Il serait aussi très informatif d'obtenir des analyses de l'effet du mutant BAG3_S284A-T285A sur la distribution de celles-ci, ainsi que sur la polarisation du nuage sous-cortical d'actine, puisque ce mutant induit des défauts de positionnement du fuseau mitotique. D'autant qu'il a été montré que l'activité de CDK1 est requise pour la formation du nuage sous-cortical d'actine (Mitsushima et al. 2010). L'ensemble de ces expériences suggérerait que la phosphorylation de BAG3 sur T285 pourrait faciliter le remodelage des structures cellulaires à base d'actine qui dirigent la distribution des fibres de rétraction dictant alors la dynamique du nuage sous-cortical d'actine et aboutissant au positionnement adéquat du fuseau mitotique. Le lien potentiel entre la phosphorylation de la T285 et de cortactine pourrait être évalué. L'obtention de telles données mettrait en évidence, pour la première fois, un mécanisme moléculaire qui dicterait la formation des fibres de rétraction.

En conclusion, les avancées récentes concernant le rôle des « *p62 bodies* » laissent sous-entendre que le complexe tertiaire BAG3-HSPB8-p62, à travers la régulation de la formation des MIBS, pourrait possiblement orchestrer la modulation spatio-temporelle d'assemblage de complexes protéiques mitotiques; à savoir si ces complexes pourraient jouer un rôle dans le remodelage de l'architecture cellulaire est une hypothèse attrayante qui demande à être testée. Une telle fonction pourrait constituer un mécanisme global de régulation de complexes, néanmoins spécifiques, ce qui expliquerait l'effet pléiotropique de la déplétion des membres du complexe BAG3-HSPB8-p62 sur différentes structures cellulaires pendant la mitose.

6.2.3. L'assemblage des « p62 bodies » mitotiques : voies alternatives possibles.

Néanmoins, il est envisageable que les « *p62 bodies* », au vu de leur fonction dans laquelle ils ont été particulièrement bien décrits, c'est-à-dire dans la dégradation des protéines ubiquitinées par autophagie sélective, soit reliés à cette voie de dégradation cellulaire pendant la mitose. Bien que le dogme d'origine concernant l'autophagie pendant la mitose fut que ce processus semblait être diminué (Eskelinen et al. 2002; Furuya et al. 2010; Rubinsztein 2010; Li et Zhang 2016), des travaux récents ont démontré que certaines formes d'autophagie pourrait persister pendant la mitose (chapitre 1, section 1.4.4; Li et al. 2016). Par exemple, un rôle pour p62 dans la dégradation de RhoA actif pendant la cytokinèse a également été observé (Belaid, Cerezo, et al. 2013). Néanmoins, l'implication de l'autophagie sélective pendant la mitose demeure encore largement controversée.

En revanche, la dégradation sélective de protéines spécifiques pour favoriser la progression du cycle cellulaire est bien caractérisée, mais concerne principalement la voie de dégradation par le protéasome, entre autres, la régulation de la dégradation des cyclines A et B (section 1.4.1.2). On peut alors s'interroger : est-ce que l'augmentation notable et progressive de la formation de « *p62 bodies* » pendant la mitose correspondrait à l'initiation de la dégradation sélective par autophagie de composants cellulaires pour assurer la progression des cellules mitotiques ? En ligne avec cette perspective, le concept de « signaléphagie » apparaît très intéressant dans le contexte de la mitose. Ce terme a été proposé pour décrire un type d'autophagie sélective qui régulerait négativement des voies de signalisation en dégradant les kinases et leurs substrats, ou même des facteurs de transcription, essentiels par exemple à la prolifération cellulaire et à la migration (Belaid, Ndiaye, et al. 2013; Belaid et al. 2014). La dégradation de RhoA actif s'inscrit d'ailleurs dans la description de ce concept, où les auteurs ont montré que la dégradation par autophagie de la GTPase maintient un niveau approprié de RhoA actif pour assurer la complétion fidèle de la cytokinèse et donc de la

transmission du génome (Belaid, Ndiaye, et al. 2013). Ce mécanisme pourrait être primordial pour assurer un contrôle spatio-temporel rapide de complexes signalétiques, et pourrait être particulièrement pertinent dans le contexte de la mitose.

Notamment, les deux hypothèses envisagés pour la fonction des MIBS de p62, c'est-à-dire la séquestration réversible des protéines pour moduler l'assemblage et/ou le désassemblage de complexes protéiques pour réguler leur activité et la signaléphagie, ne sont pas exclusifs. Les deux catégories de MIBS pourraient coexister dans les cellules. En corrélation avec cette idée, nous avons noté que certains MIBS co-distribuent avec LC3 et l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie semblent augmenter le nombre de MIBS ainsi que leur co-marquage avec LC3 (résultats non présentés).

Ainsi, le rôle de plateforme assuré par BAG3-HSPB8 permettant la modulation d'assemblage de complexes et potentiellement requis pour la régulation du remodelage des structures mitotiques à base d'actine décrit au préalable, pourrait être indépendant de la formation des MIBS. La formation de ces MIBS pourrait constituer une voie alternative ou qui agit en parallèle de ce mécanisme impliquant BAG3-HSPB8, dont le rôle reste donc à déterminer.

6.3. Perspectives possibles de ce projet.

Dans cette section, j'ai choisi de discuter de trois voies d'investigations possibles plus générales soulevées par nos résultats ou basées sur certaines de nos données préliminaires, et que je trouve particulièrement intéressantes.

6.3.1. BAG3 : une plateforme d'activation de CDK1 à la phase G2/M ?

À la phase G2, la présence de CDK1 aux centrosomes permettrait son activation par cdc25, via la déphosphorylation du résidu Y15 de CDK1, de manière dépendante de Aurora A (De Souza, Ellem, et Gabrielli 2000; Dutertre et al. 2004). Or BAG3 est enrichie dans cette région de façon dépendante de l'activité de Aurora A (chapitre 3), l'association entre BAG3 et CDK1 est stimulée dès la phase G2/M et la déplétion de BAG3 induit une augmentation de pY15 de CDK1 dans les cellules mitotiques (annexe 2). Ces observations laissent penser que BAG3 pourrait contribuer à l'activation de CDK1 dès la phase G2. Notamment, la formation d'un complexe BAG3-CDK1-filamine A est observée dès la G2/M (annexe 2). Or, filamine A jouerait un rôle de plateforme d'interaction pour

l'assemblage du complexe cdc25c, cycline B et CDK1, résultant en l'activation de CDK1 (Telles et al. 2011). De ce fait, il est envisageable que la formation d'un complexe BAG3-CDK1-filamine A favorise l'activation de CDK1 via la déphosphorylation du résidu Y15 par cdc25c. De manière intéressante, cdc25 possède un domaine SH3, suggérant que la protéine pourrait peut-être s'associer à BAG3 via le domaine PxxP. Au vu de nos résultats combinés aux données de la littérature, il est intéressant d'envisager que l'enrichissement périnucléaire de BAG3 en G2/M, de façon dépendante d'Aurora A et potentiellement de sa phosphorylation sur S195, contribuerait à la formation d'un complexe BAG3-filamine A-CDK1-cdc25-cycline B1. BAG3 agirait alors comme une plateforme d'interaction qui favoriserait l'activation de CDK1 dès la fin de la phase G2. De manière intéressante, BAG3 participerait ainsi à l'activation de la kinase dont il est la cible et qui confère sa fonction mitotique. En ligne avec cette idée, BAG3 interagit avec, et est phosphorylée de façon dépendante de FAK (Iorio et al. 2015) et réciproquement, FAK est phosphorylée et activée de manière dépendante de BAG3 (Kassis et al. 2006).

Dans la mesure où l'activation de CDK1 est clé pour l'entrée des cellules en mitose et donc pour la transition G2/M, ce modèle positionnerait BAG3 au sein d'un mécanisme insoupçonné dans la facilitation de l'entrée des cellules en mitose. Néanmoins, un lien a précédemment été reporté entre BAG3 et la progression du cycle cellulaire, et où ce dernier serait important pour faciliter la transition G1/S dans les cellules endothéliales. Brièvement, la modulation négative de l'activation de ERK par BAG3, qui assure cette fonction via le recrutement de la phosphatase DUSP6, permettrait la progression des cellules de la phase G1 à S (Falco et al. 2012). Par conséquent, à travers sa fonction de plateforme d'interaction, BAG3 faciliterait la progression du cycle cellulaire en modulant l'activité de protéines clé impliquées dans les transitions interphasiques. Cette piste d'investigation est, à mon avis, importante à explorer, en commençant par exemple, par analyser si la déplétion de BAG3 induirait des retards de l'entrée des cellules en mitose.

6.3.2. L'arrondissement des cellules mitotiques : un rôle de BAG3 dans le désassemblage des adhésions focales ?

Bien qu'un lien fonctionnel entre BAG3 et la modulation des FA ait été suggéré (Kassis et al. 2006; Iwasaki et al. 2007, 2010), les conséquences potentielles pour l'entrée des cellules en mitose n'ont pas été étudiées. La phosphorylation de BAG3 sur les résidus T285 et S386 ainsi que la formation du complexe chaperon BAG3-HSPB8-p62 sont impliquées dans le processus d'arrondissement des cellules à l'entrée de la mitose, processus qui requiert le désassemblage des adhésions focales (Dao,

Dupuy, Gavet, Caron, et Gunzburg 2009; Lancaster, Le Berre, et al. 2013; Marchesi et al. 2014). Par ailleurs, nous avons observé des défauts de ré-étalement des cellules pendant la cytokinèse suivant la déplétion de BAG3 ou HSPB8 (Varlet et al, 2017), défauts pouvant être associés à une modulation altérée de l'adhésion cellulaire (Ferreira et al. 2013; Dix et al. 2018). Enfin, une persistance des adhésions focales a été observée dans des cellules mitotiques déplétées en BAG3 qui présentent des défauts d'arrondissement (résultats non présentés, expériences préliminaires).

De plus, des études indépendantes dans la littérature ont suggéré **un lien** entre **HDAC6** (Tran et al. 2007; Efimov et al. 2008; Deakin et Turner 2014; Lafarga et al. 2012), **cortactine** (Vuori et Ruoslahti 1995; Kruchten et al. 2008; Wang, Liu, et Liao 2011; Tomar et al. 2012), **myosine II** (Webb et al. 2004; Kuo et al. 2011; Pasapera et al. 2015), **CDK1** (Jones et al. 2018), **filamine A** (Chen, Kolahi, et Mofrad 2009; Kim et McCulloch 2011; Ehrlicher et al. 2011; Liu et al. 2015; Truong, Shams, et Mofrad 2015; Sato et al. 2016) ou encore **α -actinine** (Shao et al. 2010; Ye et al. 2014; Fukumoto et al. 2015) et **la dynamique des FA**. Par exemple, le désassemblage des adhésions focales est initié en début de G2, traduit par une diminution de leur taille, et de manière importante, il a été montré que ce processus nécessite que CDK1 soit inactif (Jones et al. 2018).

Ensemble, ces observations laissent croire que le complexe BAG3-HSPB8-p62 pourrait contribuer à une potentielle régulation de la dynamique des adhésions focales au cours de la division cellulaire, probablement via la modulation spatio-temporelle adéquate de l'activité d'HDAC6 et de CDK1 sur leurs cibles. Ce modèle serait de plus en accord avec les retards d'adhésion des cellules en télophase/cytokinèse avec des siBAG3 ou de HSPB8 (Varlet et al. 2017). Par ailleurs, il serait séduisant que les protéines des adhésions focales dissoutes soient « stockées » dans les MIBS afin de les protéger de la dégradation et être rapidement recyclées au moment de la ré-adhésion. De manière importante, nous avons obtenu des évidences préliminaires qui indiquent, myosine II, filamine A et α -actinine sont détectées dans les MIBS de p62 pendant la mitose (résultats non publiés).

Par ailleurs, des études ont suggéré un lien entre l'autophagie et la modulation des adhésions focales. En l'occurrence, l'ABP paxilline est dégradée par autophagie pour permettre le désassemblage des adhésions focales, de manière dépendante de sa phosphorylation par Src (Sharifi et al. 2016). Or BAG3 module l'activité de Src de façon dépendante de son association à HSP70 (Colvin et al. 2014). En parallèle, des résultats du laboratoire ont montré que l'inhibition de l'autophagie, suivant la déplétion d'ATG7 (nécessaire à la formation des autophagosomes, résultats

non présentés d'A.A. Varlet) ou suivant l'ajout de bafilomycine (drogue inhibant le flux autophagique, résultats non présentés de S. Guilbert), induisent des défauts d'arrondissement des cellules. De surcroît, filamine A, qui a pour fonction d'inactiver les adhésions focales et est donc impliquée dans la dynamique de ces dernières (Liu et al. 2015), constitue l'unique substrat autophagique connu de BAG3 au sein du mécanisme de la CASA (Ulbricht et al. 2013; Kathage et al. 2017). Point important à souligner : dans ce processus, la dénaturation de filamine A par son étirement pendant la contraction musculaire se produit aux costamères, qui sont les « adhésions focales » des cellules musculaires. L'ensemble de ces données nous laisse donc penser que BAG3, potentiellement en lien avec sa fonction autophagique, pourrait être impliquée dans la modulation de la dynamique des adhésions focales avant la division cellulaire.

6.3.3. BAG3 et le mécanisme de la CASA en réponse aux tensions mécaniques: un contrôle de qualité des protéines du cytosquelette d'actine qui ne serait pas restreint aux cellules musculaires ?

Devant les évidences croissantes de la littérature ainsi que les résultats obtenus au sein du laboratoire, BAG3 semblerait faciliter le contrôle spatio-temporel d'assemblage et/ou de désassemblage de complexes moléculaires qui ont pour fonction de moduler la dynamique du cytosquelette lorsque ce dernier subit des changements morphologiques importants et en lien avec des tensions mécaniques élevées. En mitose comme au cours de la contraction des cellules musculaires, le cytosquelette cellulaire est soumis à des tensions mécaniques importantes qui influencent sa dynamique et ses éléments le constituant (Schiffhauer et al. 2016).

Bien que la contraction soit probablement le contexte physiologique dans lequel les structures cellulaires subissent le plus de tensions mécaniques (intenses et chroniques), d'autres processus physiologiques engendrent également l'application de tensions mécaniques, comme mentionné dans le chapitre 1 de cette thèse, dont la migration ou la mitose. Par exemple, la modulation de la tension corticale dépendante du réseau d'actomyosine permet aux cellules de contrôler leur volume et leur forme (Stewart et al. 2011). Par ailleurs, les fibres de rétractions en collaboration avec le nuage sous-cortical d'actine génèrent les tensions adéquates pour positionner le fuseau mitotique (Fink et al. 2011). Le mécanisme de la CASA a été découvert et étudié principalement dans des cellules musculaires actuellement, où il est essentiel pour assurer l'intégrité de l'architecture des cellules musculaires (Arndt et al. 2010; Ulbricht et al. 2013, 2015). Par exemple, les auteurs ont constaté une implication de la CASA dans la migration des cellules. Il serait ainsi plausible que ce

mécanisme de CQP soit en charge, de manière générale, de l'intégrité des structures à base d'actine en réponse aux tensions mécaniques. Entre autres, ce mécanisme pourrait être central au moment où la cellule subit la réorganisation la plus drastique au cours de sa vie, et dont chaque étape est soumise à différentes tensions mécaniques, c'est-à-dire pendant la mitose. Pour établir la preuve de concept que de l'autophagie sélective peut être déclenchée en réponse à des tensions mécaniques, notamment dans le contexte de la mitose, le lien entre BAG3, la formation des MIBS et les changements de tensions corticales et de rigidité serait à étudier. Par exemple, des techniques telles que l'AFM (« *Atomic Force Microscopy* ») couplée à l'application de forces de compression ou d'étirement sur des cellules mitotiques suivant la déplétion de BAG3 ou par exemple exprimant un mutant de p62 qui ne pourrait pas former d'oligomères pourraient être exploitées. L'analyse des changements du flux autophagique dans ces conditions serait alors à évaluer.

Par exemple, il serait envisageable que des protéines mécano-sensibles du cortex mitotique d'actine, comme α -actinine, filamine A, myosine II ou CapZ β (Toyoda et al. 2017; Chugh et al. 2017), subissent une dénaturation lors de l'augmentation de la tension corticale. Ceci pourrait conduire à l'activation de la CASA afin d'assurer l'intégrité du cortex mitotique essentiel au positionnement du fuseau. Ces protéines pourraient-elles être de nouveaux clients autophagiques de BAG3, par l'intermédiaire de la CASA ? Le système « *Clover-Rubby* » (système de capteur en tandem « *Clover* » en vert et « *Rubby* » en rouge) pourrait être utilisé pour définir en microscopie en cellules vivantes si ces protéines sont dégradées par autophagie pendant la mitose. En effet, en raison de l'instabilité de « *Clover* » à un pH faible tel que le pH du lysosome (Klionsky et al. 2016), l'extinction du signal de fluorescence « *Clover* » est un indicateur de la fusion autophagosome/lysosome. L'utilisation de constructions de filamine A-clover-rubby ou de α -actinine-clover-rubby dans des cellules mitotiques suivant la déplétion de BAG3, HSPB8 ou p62 permettrait de déterminer de manière claire si ces protéines d'intérêt sont des substrats de l'autophagie sélective dépendante du complexe chaperon BAG3-HSPB8.

Spéculer que la CASA serait un processus central pendant la mitose, pourrait sembler contradictoire avec les résultats de notre première étude où nous avons montré que les fonctions mitotiques de BAG3 semblent indépendantes de sa liaison à HSC/HSP70 (Fuchs et al. 2015), puisque le mécanisme de la CASA fait intervenir l'activité d'HSC70 (Arndt et al. 2010). Néanmoins, il est important de noter que le rôle de l'association entre BAG3 et HSP70 pendant la mitose a été analysé uniquement sur le positionnement du fuseau mitotique. Il en est de même pour le domaine WW, qui est requis pour la fonction autophagique de BAG3, mais qui corrige les défauts

d'orientation du fuseau mitotique (résultats non présentés). Or, la mutation de S385 et S386 sur BAG3 interfère avec le processus d'arrondissement, mais pas avec le positionnement du fuseau mitotique (chapitre 3). Il serait donc nécessaire d'analyser si le mutant de BAG3 qui perd sa liaison à HSP70 (R480A) et le mutant de délétion du domaine WW sont en mesure de corriger les défauts d'arrondissement mitotique.

En conclusion, ces différentes pistes de réflexion nous laissent à penser que la CASA pourrait être un mécanisme qui ne serait pas spécifique aux cellules musculaires, mais participerait au contraire au contrôle de qualité des composants du cytosquelette et de son architecture d'une manière générale en réponse à des tensions mécaniques. La CASA pourrait alors constituer un processus central dans la mécanotransduction cellulaire.

En lien avec cette possibilité, deux études fournissent des pistes allant dans ce sens et établissent une potentielle connexion entre HSPB8, p62, RhoA actif et l'autophagie. Dans un modèle de contraction forcée des cardiomyocytes, une augmentation de l'activation de RhoA est induite et coïncide avec une augmentation du nombre de fibres de stress (Ke et al. 2011). Dans ce contexte, ce processus est contré par la surexpression HSPB8, où il a été montré que HSPB8 agirait en réduisant l'activation de RhoA. De manière importante, comme mentionné au préalable, RhoA actif est dégradée par autophagie sélective, suggérée par la séquestration de RhoA par p62, pendant la migration cellulaire et la cytokinèse (Belaid, Cerezo, et al. 2013; Belaid et al. 2014). Il est alors raisonnable de présumer que p62 et HSPB8, et possiblement BAG3, soient impliquées ensemble dans ce mécanisme de modulation de RhoA actif via sa dégradation par autophagie. Bien qu'une telle fonction reste à établir clairement, ces éléments constituent une piste d'investigation sérieuse pour tester le modèle que nous proposons. D'autant qu'une régulation spatio-temporelle fine de l'activité de RhoA doit être médiée pendant la mitose. Une inhibition locale de RhoA au niveau des FA est requise pour favoriser leur dissolution (Marchesi et al. 2014) tandis que son activation est essentielle pour la formation du cortex rigide d'actomyosine (Maddox et Burridge 2003). Il est aussi important de souligner que le processus d'inhibition est spécifiquement localisé au niveau des FA et n'interfère pas avec l'activité globale de RhoA. Ceci illustre parfaitement la nécessité de mécanismes de régulation spatio-temporelle de l'activité enzymatique de protéines régulatrices de la dynamique d'actine par les acteurs du CQP afin d'assurer une morpho-dynamique adéquate des cellules.

Selon ces hypothèses, la formation des MIBS pourrait assurer une régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine par la modulation de la séquestration et/ou de la dégradation de protéines régulatrices de ce dernier.

Conclusion

La morpho-dynamique des cellules implique un contrôle spatio-temporel précis du remodelage du cytosquelette d'actine. Cette dynamique est particulièrement exacerbée pendant la division cellulaire au cours de laquelle des changements dans la forme cellulaire orchestrent chacune des étapes de la mitose. Cependant, comment la cellule assure le maintien de l'intégrité de telles structures soumises à des cycles d'assemblage/désassemblage demeure une question ouverte. Bien que de nombreuses composantes majeures et des régulateurs clé de ces structures mitotiques à base d'actine commencent à être bien caractérisés, il n'en demeure pas moins que les mécanismes qui gèrent cette haute dynamique spatio-temporelle, tout comme ceux qui régulent la ségrégation localisée des complexes multi-protéiques responsables de ce remodelage, demeurent peu compris. De plus, peu d'éléments sont connus concernant les mécanismes qui permettraient à toutes ces protéines de fonctionner comme un ensemble intégré et modulable par les réseaux signalétiques. En ce sens néanmoins, les mécanismes de CQP et ces acteurs émergent comme des « modulateurs spatio-temporels » orchestrant, entre autres, l'assemblage/désassemblage de complexes et la dégradation ciblée des protéines. De ce fait, ils sont de plus en plus associés à un remodelage précis du cytosquelette d'actine ainsi qu'à la maintenance de son intégrité. Des évidences de l'existence de tels processus pendant la mitose commencent à voir le jour.

Les travaux de cette thèse fournissent des évidences que le complexe chaperon BAG3-HSPB8 est impliqué dans la modulation spatio-temporelle de structures dynamiques à base d'actine au cours de la division des cellules hautement prolifératives comme les cellules cancéreuses. Une telle fonction impliquerait une régulation de l'action de BAG3 à travers sa phosphorylation dynamique sur des sites spécifiques. D'une part, celle-ci modulerait son association avec diverses protéines régulatrices de l'actine ainsi qu'avec des enzymes, en l'occurrence CDK1 et HDAC6. D'ailleurs la modulation de l'activité de HDAC6 serait l'un des mécanismes moléculaires par lequel le complexe BAG3-HSPB8 serait en mesure de limiter la dynamique d'actine dans les cellules mitotiques. D'autre part, nous avons découvert que BAG3 phosphorylée sur ses sites mitotiques de concert avec HSPB8, facilite l'assemblage moléculaire de p62, un acteur majeur du CQP, au sein de structures hautement organisées.

En conclusion, cette étude a mis en avant que l'assemblage dynamique de complexes multi-protéiques, composés d'acteurs du CQP et de régulateurs de l'actine, serait impliqué dans la modulation spatio-temporelle des structures mitotiques d'actine qui dirigent la mitose. D'une

manière globale, ces travaux ouvrent la perspective que le complexe BAG3-HSPB8-p62 pourrait potentiellement constituer une plateforme d'interaction capable de créer une interface entre signalisation et/ou dégradation et remodelage dynamique de l'actine pendant la division cellulaire. L'ensemble de ces résultats appuie l'hypothèse que le CQP contrôle la dynamique de l'actine dans un contexte physiologique, et qu'une telle fonction pourrait favoriser la survie des cellules cancéreuses et leur prolifération, tout comme contribuer à l'invasion tumorale. De manière importante, ces travaux ont mis en évidence un nombre important de nouveaux interacteurs du complexe chaperon formé par BAG3 et HSPB8, pouvant donc offrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour des pathologies impliquant une dérégulation de ce complexe chaperon.

Bibliographie

- Abe, Satoshi, Kota Nagasaka, Youko Hirayama, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, Yutaka Aoyagi, Chikashi Obuse, et Toru Hirota. 2011. « The Initial Phase of Chromosome Condensation Requires Cdk1-Mediated Phosphorylation of the CAP-D3 Subunit of Condensin II ». *Genes & Development* 25 (8): 863-74. <https://doi.org/10.1101/gad.2016411>.
- Acquaviva, C., et J. Pines. 2006. « The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome: APC/C ». *Journal of Cell Science* 119 (12): 2401-4. <https://doi.org/10.1242/jcs.02937>.
- Acunzo, Julie. 2012. « Small Heat Shock Proteins HSP27 (HspB1), AB-Crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as Regulators of Cell Death ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (10): 1622-31. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.002>.
- Acunzo, Julie, Maria Katsogiannou, et Palma Rocchi. 2012. « Small Heat Shock Proteins HSP27 (HspB1), AB-Crystallin (HspB5) and HSP22 (HspB8) as Regulators of Cell Death ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (10): 1622-31. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.04.002>.
- Agarwal, Priti, et Ronen Zaidel-Bar. 2018. « Principles of Actomyosin Regulation In Vivo ». *Trends in Cell Biology*, octobre. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.09.006>.
- Alfieri, Claudio, Suyang Zhang, et David Barford. 2017. « Visualizing the Complex Functions and Mechanisms of the Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) ». *Open Biology* 7 (11): 170204. <https://doi.org/10.1098/rsob.170204>.
- Amann, Kurt J., et Thomas D. Pollard. 2001. « The Arp2/3 Complex Nucleates Actin Filament Branches from the Sides of Pre-Existing Filaments ». *Nature Cell Biology* 3 (3): 306-10. <https://doi.org/10.1038/35060104>.
- Amano, Mutsuki, Masaaki Ito, Kazushi Kimura, Yuko Fukata, Kazuyasu Chihara, Takeshi Nakano, Yoshiharu Matsuura, et Kozo Kaibuchi. 1996. « Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase) ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20246-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20246>.
- Ammirante, Massimo, Alessandra Rosati, Claudio Arra, Anna Basile, Antonia Falco, Michela Festa, Maria Pascale, et al. 2010. « IKK γ Protein Is a Target of BAG3 Regulatory Activity in Human Tumor Growth ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (16): 7497-7502. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907696107>.
- Aquilina, J. Andrew, Justin L. P. Benesch, Lin Lin Ding, Orna Yaron, Joseph Horwitz, et Carol V. Robinson. 2004. « Phosphorylation of AlphaB-Crystallin Alters Chaperone Function through Loss of Dimeric Substructure ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (27): 28675-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403348200>.
- Arndt, Verena, Nikolaus Dick, Riga Tawo, Michael Dreiseidler, Daniela Wenzel, Michael Hesse, Dieter O. Fürst, et al. 2010. « Chaperone-Assisted Selective Autophagy Is Essential for Muscle Maintenance ». *Current Biology: CB* 20 (2): 143-48. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.022>.
- Arrigo, A.-P., et B. Gibert. 2012. « HspB1 Dynamic Phospho-Oligomeric Structure Dependent Interactome as Cancer Therapeutic Target ». *Current Molecular Medicine* 12 (9): 1151-63.
- Asteriti, Italia Anna, Fabiola De Mattia, et Giulia Guarguaglini. 2015. « Cross-Talk between AURKA and Plk1 in Mitotic Entry and Spindle Assembly ». *Frontiers in Oncology* 5 (décembre). <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00283>.
- Atherton-Fessler, S, F Liu, B Gabrielli, M S Lee, C Y Peng, et H Piwnica-Worms. 1994. « Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases. » *Molecular Biology of the Cell* 5 (9): 989-1001.
- Aurelian, Laure. 2001. « A Novel Gene Expressed in Human Keratinocytes with Long-Term In Vitro Growth Potential Is Required for Cell Growth ». *Journal of Investigative Dermatology* 116 (2): 286-95. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.00191.x>.
- Awan, M. Umer Farooq, et Yulin Deng. 2014. « Role of Autophagy and Its Significance in Cellular Homeostasis ». *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (12): 5319-28. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5721-8>.
- Baird, Nathan A., Peter M. Douglas, Milos S. Simic, Ana R. Grant, James J. Moresco, Suzanne C. Wolff, John R. Yates, Gerard Manning, et Andrew Dillin. 2014. « HSF-1-Mediated Cytoskeletal Integrity Determines Thermotolerance and Life Span ». *Science (New York, N.Y.)* 346 (6207): 360-63. <https://doi.org/10.1126/science.1253168>.

- Bakthisaran, Raman, Kranthi Kiran Akula, Ramakrishna Tangirala, et Ch Mohan Rao. 2016. « Phosphorylation of AB-Crystallin: Role in Stress, Aging and Patho-Physiological Conditions ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1860 (1 Pt B): 167-82. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.017>.
- Bakthisaran, Raman, Ramakrishna Tangirala, et Ch. Mohan Rao. 2015. « Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1854 (4): 291-319. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>.
- Balchin, David, Manajit Hayer-Hartl, et F. Ulrich Hartl. 2016. « In Vivo Aspects of Protein Folding and Quality Control ». *Science (New York, N.Y.)* 353 (6294): aac4354. <https://doi.org/10.1126/science.aac4354>.
- Bandyopadhyay, Urmi, Sunandini Sridhar, Susmita Kaushik, Roberta Kiffin, et Ana Maria Cuervo. 2010. « Identification of Regulators of Chaperone-Mediated Autophagy ». *Molecular Cell* 39 (4): 535-47. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.004>.
- Baranova, E. V., S. Beelen, N. B. Gusev, et S. V. Strelkov. 2009. « The Taming of Small Heat-Shock Proteins: Crystallization of the Alpha-Crystallin Domain from Human Hsp27 ». *Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology and Crystallization Communications* 65 (Pt 12): 1277-81. <https://doi.org/10.1107/S1744309109044571>.
- Bar-Lavan, Yael, Netta Shemesh, et Anat Ben-Zvi. 2016. « Chaperone Families and Interactions in Metazoa ». *Essays in Biochemistry* 60 (2): 237-53. <https://doi.org/10.1042/EBC20160004>.
- Barral, José M., Alex H. Hutagalung, Achim Brinker, F. Ulrich Hartl, et Henry F. Epstein. 2002. « Role of the Myosin Assembly Protein UNC-45 as a Molecular Chaperone for Myosin ». *Science* 295 (5555): 669-71. <https://doi.org/10.1126/science.1066648>.
- Barretta, Maria Luisa, Daniela Spano, Chiara D'Ambrosio, Romina Ines Cervigni, Andrea Scaloni, Daniela Corda, et Antonino Colanzi. 2016. « Aurora-A recruitment and centrosomal maturation are regulated by a Golgi-activated pool of Src during G2 ». *Nature Communications* 7 (mai). <https://doi.org/10.1038/ncomms11727>.
- Basha, Eman, Kenneth L. Friedrich, et Elizabeth Vierling. 2006. « The N-Terminal Arm of Small Heat Shock Proteins Is Important for Both Chaperone Activity and Substrate Specificity ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (52): 39943-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607677200>.
- Behl, Christian. 2011. « BAG3 and Friends: Co-Chaperones in Selective Autophagy during Aging and Disease ». *Autophagy* 7 (7): 795-98. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15844>.
- Behl, Christian. 2016. « Breaking BAG: The Co-Chaperone BAG3 in Health and Disease ». *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (8): 672-88. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.04.007>.
- Belaid, Amine, Michaël Cerezo, Abderrahman Chargui, Elisabeth Corcelle-Termeau, Florence Pedetour, Sandy Giuliano, Marius Ilie, et al. 2013. « Autophagy Plays a Critical Role in the Degradation of Active RHOA, the Control of Cell Cytokinesis, and Genomic Stability ». *Cancer Research* 73 (14): 4311-22. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4142>.
- Belaid, Amine, Papa Diogop Ndiaye, Michaël Cerezo, Laurence Cailleteau, Patrick Brest, Daniel J Klionsky, Georges F Carle, Paul Hofman, et Baharia Mograbi. 2014. « Autophagy and SQSTM1 on the RHOA(d) again ». *Autophagy* 10 (2): 201-8. <https://doi.org/10.4161/auto.27198>.
- Belaid, Amine, Papa Diogop Ndiaye, Daniel J Klionsky, Paul Hofman, et Baharia Mograbi. 2013. « Signalphagy ». *Autophagy* 9 (10): 1629-30. <https://doi.org/10.4161/auto.25880>.
- Benndorf, Rainer, Xiankui Sun, Robert R. Gilmont, Kelli J. Biederman, Mark P. Molloy, Craig W. Goodmurphy, Hong Cheng, Philip C. Andrews, et Michael J. Welsh. 2001. « HSP22, a New Member of the Small Heat Shock Protein Superfamily, Interacts with Mimic of Phosphorylated HSP27 (3DHSP27) ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (29): 26753-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103001200>.
- Bergstrahl, Dan T., Nicole S. Dawney, et Daniel St Johnston. 2017. « Spindle Orientation: A Question of Complex Positioning ». *Development* 144 (7): 1137-45. <https://doi.org/10.1242/dev.140764>.
- Bershady, Alexander D., Christoph Ballestrem, Letizia Carramusa, Yuliya Zilberman, Benoit Gilquin, Saadi Khochbin, Antonina Y. Alexandrova, Alexander B. Verkhovskiy, Tom Shemesh, et Michael M. Kozlov. 2006. « Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models ». *European Journal of Cell Biology* 85 (3): 165-73. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2005.11.001>.
- Biro, Maté, Yves Romeo, Sonja Kroschwald, Miia Bovellan, Annett Boden, Joseph Tcherkezian, Philippe P. Roux, Guillaume Charras, et Ewa K. Paluch. 2013. « Cell Cortex Composition and Homeostasis

- Resolved by Integrating Proteomics and Quantitative Imaging ». *Cytoskeleton* 70 (11): 741-54. <https://doi.org/10.1002/cm.21142>.
- Bjørkøy, Geir, Trond Lamark, Andreas Brech, Heidi Outzen, Maria Perander, Aud Øvervatn, Harald Stenmark, et Terje Johansen. 2005. « P62/SQSTM1 Forms Protein Aggregates Degraded by Autophagy and Has a Protective Effect on Huntingtin-Induced Cell Death ». *The Journal of Cell Biology* 171 (4): 603-14. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507002>.
- Boncoraglio, Alessandra, Melania Minoia, et Serena Carra. 2012a. « The Family of Mammalian Small Heat Shock Proteins (HSPBs): Implications in Protein Deposit Diseases and Motor Neuropathies ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (10): 1657-69. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.011>.
- Bornens, Michel. 2012. « The Centrosome in Cells and Organisms ». *Science* 335 (6067): 422-26. <https://doi.org/10.1126/science.1209037>.
- Bouhy, Delphine, Manisha Juneja, Istvan Katona, Anne Holmgren, Bob Asselbergh, Vicky De Winter, Tino Hocheppied, et al. 2018. « A Knock-in/Knock-out Mouse Model of HSPB8-Associated Distal Hereditary Motor Neuropathy and Myopathy Reveals Toxic Gain-of-Function of Mutant Hspb8 ». *Acta Neuropathologica* 135 (1): 131-48. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1756-0>.
- Bova, M. P., O. Yaron, Q. Huang, L. Ding, D. A. Haley, P. L. Stewart, et J. Horwitz. 1999. « Mutation R120G in AlphaB-Crystallin, Which Is Linked to a Desmin-Related Myopathy, Results in an Irregular Structure and Defective Chaperone-like Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11): 6137-42.
- Bovellan, Miia, Yves Romeo, Maté Biro, Annett Boden, Priyamvada Chugh, Amina Yonis, Malti Vaghela, et al. 2014. « Cellular Control of Cortical Actin Nucleation ». *Current Biology* 24 (14): 1628-35. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.05.069>.
- Brackley, Karen I., et Julie Grantham. 2009. « Activities of the Chaperonin Containing TCP-1 (CCT): Implications for Cell Cycle Progression and Cytoskeletal Organisation. » *Cell Stress and Chaperones* 14 (1): 23-31. <https://doi.org/10.1007/s12192-008-0057-x>.
- Brophy, C. M., S. Lamb, et A. Graham. 1999. « The Small Heat Shock-Related Protein-20 Is an Actin-Associated Protein ». *Journal of Vascular Surgery* 29 (2): 326-33.
- Cadart, Clotilde, Ewa Zlotek-Zlotkiewicz, Maël Le Berre, Matthieu Piel, et Helen K. Matthews. 2014. « Exploring the Function of Cell Shape and Size during Mitosis ». *Developmental Cell* 29 (2): 159-69. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.009>.
- Calderwood, Stuart K., et Jianlin Gong. 2016. « Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket ». *Trends in Biochemical Sciences* 41 (4): 311-23. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.003>.
- Calderwood, Stuart K., et Ayesha Murshid. 2017. « Molecular Chaperone Accumulation in Cancer and Decrease in Alzheimer's Disease: The Potential Roles of HSF1 ». *Frontiers in Neuroscience* 11 (avril). <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00192>.
- Cappola, Thomas P., Mingyao Li, Jing He, Bonnie Ky, Joan Gilmore, Liming Qu, Brendan Keating, et al. 2010. « Common Variants in HSPB7 and FRMD4B Associated with Advanced Heart Failure ». *Circulation. Cardiovascular Genetics* 3 (2): 147-54. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.109.898395>.
- Carmena, Mar, Sandrine Ruchaud, et William C Earnshaw. 2009. « Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins ». *Current Opinion in Cell Biology* 21 (6): 796-805. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.008>.
- Caron, Emmanuelle. 2003. « Cellular Functions of the Rap1 GTP-Binding Protein: A Pattern Emerges ». *Journal of Cell Science* 116 (3): 435-40. <https://doi.org/10.1242/jcs.00238>.
- Carra, Serena, Simon Alberti, Patrick A. Arrigo, Justin L. Benesch, Ivor J. Benjamin, Wilbert Boelens, Britta Bartelt-Kirbach, et al. 2017. « The Growing World of Small Heat Shock Proteins: From Structure to Functions ». *Cell Stress & Chaperones*, mars. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0787-8>.
- Carra, Serena, Paola Rusmini, Valeria Crippa, Elisa Giorgetti, Alessandra Boncoraglio, Riccardo Cristofani, Maximillian Naujock, et al. 2013. « Different Anti-Aggregation and pro-Degradative Functions of the Members of the Mammalian SHSP Family in Neurological Disorders ». *Phil. Trans. R. Soc. B* 368 (1617): 20110409. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0409>.
- Carra, Serena, Samuel J. Seguin, Herman Lambert, et Jacques Landry. 2008a. « HspB8 Chaperone Activity toward Poly(Q)-Containing Proteins Depends on Its Association with Bag3, a Stimulator of Macroautophagy ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (3): 1437-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706304200>.

- Carra, Serena, Samuel J. Seguin, et Jacques Landry. 2008. « HspB8 and Bag3: A New Chaperone Complex Targeting Misfolded Proteins to Macroautophagy ». *Autophagy* 4 (2): 237-39.
- Carra, Serena, Mitchel Sivilotti, Chávez Zobel, Aura T, Herman Lambert, et Jacques Landry. 2005. « HspB8, a Small Heat Shock Protein Mutated in Human Neuromuscular Disorders, Has in Vivo Chaperone Activity in Cultured Cells ». *Human Molecular Genetics* 14 (12): 1659-69. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi174>.
- Carreno, Sébastien, Ilektra Kouranti, Edith Szafer Glusman, Margaret T. Fuller, Arnaud Echard, et François Payre. 2008. « Moesin and Its Activating Kinase Slik Are Required for Cortical Stability and Microtubule Organization in Mitotic Cells ». *J Cell Biol* 180 (4): 739-46. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709161>.
- Castro, Anna, et Thierry Lorca. 2018. « Greatwall Kinase at a Glance ». *J Cell Sci* 131 (20): jcs222364. <https://doi.org/10.1242/jcs.222364>.
- Castro, Ines J. de, Raquel Sales Gil, Lorena Ligammari, Maria Laura Di Giacinto, Paola Vagnarelli, Ines J. de Castro, Raquel Sales Gil, Lorena Ligammari, Maria Laura Di Giacinto, et Paola Vagnarelli. 2017. « CDK1 and PLK1 coordinate the disassembly and reassembly of the nuclear envelope in vertebrate mitosis ». *Oncotarget* 9 (8): 7763-73. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23666>.
- Catalano, Myriam, Giuseppina D'Alessandro, Francesca Lepore, Marco Corazzari, Sara Caldarola, Cristina Valacca, Fiorella Faienza, et al. 2015. « Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells ». *Molecular Oncology* 9 (8): 1612-25. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.04.016>.
- Cattin, Cedric J., Marcel Düggelin, David Martinez-Martin, Christoph Gerber, Daniel J. Müller, et Martin P. Stewart. 2015. « Mechanical Control of Mitotic Progression in Single Animal Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (36): 11258-63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502029112>.
- Cazales, Martine, Estelle Schmitt, Emilie Montembault, Christine Dozier, Claude Prigent, et Bernard Ducommun. 2005. « CDC25B Phosphorylation by Aurora A Occurs at the G2/M Transition and is Inhibited by DNA Damage ». *Cell Cycle* 4 (9): 1233-38. <https://doi.org/10.4161/cc.4.9.1964>.
- Chalut, Kevin J., et Ewa K. Paluch. 2016. « The Actin Cortex: A Bridge between Cell Shape and Function ». *Developmental Cell* 38 (6): 571-73. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.011>.
- Chanet, Soline, Rishabh Sharan, Zia Khan, et Adam C. Martin. 2017. « Myosin 2-Induced Mitotic Rounding Enables Columnar Epithelial Cells to Interpret Cortical Spindle Positioning Cues ». *Current Biology* 27 (21): 3350-3358.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.039>.
- Chang, Donald C., Naihan Xu, et Kathy Q. Luo. 2003. « Degradation of Cyclin B Is Required for the Onset of Anaphase in Mammalian Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (39): 37865-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306376200>.
- Chen, Chao, Qing-Yu Liang, Hui-Kang Chen, Pin-Fei Wu, Zhen-Yu Feng, Xiao-Ming Ma, Hao-Rong Wu, et Guo-Qiang Zhou. 2018. « DRAM1 regulates the migration and invasion of hepatoblastoma cells via autophagy-EMT pathway ». *Oncology Letters* 16 (2): 2427-33. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8937>.
- Chen, Guo, et Xingming Deng. 2018. « Cell Synchronization by Double Thymidine Block ». *Bio-protocol* 8 (17). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2994>.
- Chen, Harvey S., Kevin S. Kolahi, et Mohammad R. K. Mofrad. 2009. « Phosphorylation Facilitates the Integrin Binding of Filamin under Force ». *Biophysical Journal* 97 (12): 3095-3104. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.08.059>.
- Chen, Ying, Li-Na Yang, Li Cheng, Shun Tu, Shu-Juan Guo, Huang-Ying Le, Qian Xiong, et al. 2013. « Bcl2-Associated Athanogene 3 Interactome Analysis Reveals a New Role in Modulating Proteasome Activity ». *Molecular & Cellular Proteomics* 12 (10): 2804-19. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.025882>.
- Chen, Zhijian J., et Lijun J. Sun. 2009. « Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling ». *Molecular Cell* 33 (3): 275-86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.014>.
- Chiti, Fabrizio, et Christopher M. Dobson. 2017. « Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade ». *Annual Review of Biochemistry* 86 (juin): 27-68. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045115>.
- Choi, Jeong-Sun, Jeong-Hwa Lee, Ha-Young Kim, Myung-Hoon Chun, Jin-Woong Chung, et Mun-Yong Lee. 2006. « Developmental expression of Bis protein in the cerebral cortex and hippocampus of rats ». *Brain Research* 1092 (1): 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.02.137>.
- Choi, Jeong-Sun, Jeong-Hwa Lee, Yoo-Jin Shin, Ji-Yeon Lee, Hou Yun, Myung-Hoon Chun, et Mun-Yong Lee. 2009. « Transient Expression of Bis Protein in Midline Radial Glia in Developing Rat

- Brainstem and Spinal Cord ». *Cell and Tissue Research* 337 (1): 27-36. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0794-x>.
- Chowdary, Tirumala Kumar, Bakthisaran Raman, Tangirala Ramakrishna, et Chintalagiri Mohan Rao. 2004. « Mammalian Hsp22 is a heat-inducible small heat-shock protein with chaperone-like activity ». *Biochemical Journal* 381 (Pt 2): 379-87. <https://doi.org/10.1042/BJ20031958>.
- Christian, Frank, Eberhard Krause, Miles D. Houslay, et George S. Baillie. 2014. « PKA phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates PB1 domain interaction partner binding ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 (11): 2765-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.07.021>.
- Chugh, Priyamvada, Andrew G. Clark, Matthew B. Smith, Davide A. D. Cassani, Kai Dierkes, Anan Ragab, Philippe P. Roux, Guillaume Charras, Guillaume Salbreux, et Ewa K. Paluch. 2017. « Actin Cortex Architecture Regulates Cell Surface Tension ». *Nature Cell Biology* 19 (6): 689-97. <https://doi.org/10.1038/ncb3525>.
- Chugh, Priyamvada, et Ewa K. Paluch. 2018. « The Actin Cortex at a Glance ». *J Cell Sci* 131 (14): jcs186254. <https://doi.org/10.1242/jcs.186254>.
- Ciechanover, Aaron, et Ariel Stanhill. 2014. « The complexity of recognition of ubiquitinated substrates by the 26S proteasome ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Ubiquitin-Proteasome System*, 1843 (1): 86-96. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.007>.
- Ciobanasu, Corina, Bruno Faivre, et Christophe Le Clainche. 2013. « Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: The multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions ». *European Journal of Cell Biology, SPP 1464:Actin Dynamics – Part I*, 92 (10): 339-48. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2013.10.009>.
- Ciuffa, Rodolfo, Trond Lamark, Abul K. Tarafder, Audrey Guesdon, Sofia Rybina, Wim J. H. Hagen, Terje Johansen, et Carsten Sachse. 2015. « The Selective Autophagy Receptor P62 Forms a Flexible Filamentous Helical Scaffold ». *Cell Reports* 11 (5): 748-58. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.062>.
- Clarke, Joseph P., et Karen M. Mearow. 2013. « Cell Stress Promotes the Association of Phosphorylated HspB1 with F-Actin ». *PloS One* 8 (7): e68978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068978>.
- Clerico, Eugenia M., Joseph M. Tilitsky, Wenli Meng, et Lila M. Gierasch. 2015. « How Hsp70 Molecular Machines Interact with Their Substrates to Mediate Diverse Physiological Functions ». *Journal of Molecular Biology, Molecular Chaperones and Protein Quality Control (Part I)*, 427 (7): 1575-88. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.004>.
- Clute, Paul, et Jonathon Pines. 1999. « Temporal and Spatial Control of Cyclin B1 Destruction in Metaphase ». *Nature Cell Biology* 1 (2): 82-87. <https://doi.org/10.1038/10049>.
- Colvin, Teresa A., Vladimir L. Gabai, Jianlin Gong, Stuart K. Calderwood, Hu Li, Suryaram Gummuluru, Olga N. Matchuk, et al. 2014. « Hsp70–Bag3 Interactions Regulate Cancer-Related Signaling Networks ». *Cancer Research* 74 (17): 4731-40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0747>.
- Connell, Patrice, Carol A. Ballinger, Jihong Jiang, Yaxu Wu, Larry J. Thompson, Jörg Höhfeld, et Cam Patterson. 2001. « The Co-Chaperone CHIP Regulates Protein Triage Decisions Mediated by Heat-Shock Proteins ». *Nature Cell Biology* 3 (1): 93-96. <https://doi.org/10.1038/35050618>.
- Cox, Dezaerae, et Heath Ecroyd. 2017. « The Small Heat Shock Proteins AB-Crystallin (HSPB5) and Hsp27 (HSPB1) Inhibit the Intracellular Aggregation of α -Synuclein ». *Cell Stress & Chaperones*, mars. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0785-x>.
- Cramer, L P, et T J Mitchison. 1997. « Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding. » *Molecular Biology of the Cell* 8 (1): 109-19. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.1.109>.
- Cramer, Louise P., Margaret Siebert, et Timothy J. Mitchison. 1997. « Identification of Novel Graded Polarity Actin Filament Bundles in Locomoting Heart Fibroblasts: Implications for the Generation of Motile Force ». *The Journal of Cell Biology* 136 (6): 1287-1305.
- Crippa, Valeria, Alessandra Boncoraglio, Mariarita Galbiati, Tanya Aggarwal, Paola Rusmini, Elisa Giorgetti, Riccardo Cristofani, Serena Carra, Maria Pennuto, et Angelo Poletti. 2013. « Differential autophagy power in the spinal cord and muscle of transgenic ALS mice ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7 (novembre). <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00234>.
- Cuijpers, Sabine A. G., et Alfred C. O. Vertegaal. 2018. « Guiding Mitotic Progression by Crosstalk between Post-translational Modifications ». *Trends in Biochemical Sciences* 43 (4): 251-68. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.02.004>.

- Cukier I. Howard, Li Yun, et Lee Jonathan M. 2007. « Cyclin B1/Cdk1 binds and phosphorylates Filamin A and regulates its ability to cross-link actin ». *FEBS Letters* 581 (8): 1661-72. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.041>.
- Danieli, Alberto, et Sascha Martens. 2018. « P62-Mediated Phase Separation at the Intersection of the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy ». *J Cell Sci* 131 (19): jcs214304. <https://doi.org/10.1242/jcs.214304>.
- Dao, Vi Thuy, Aurélien Guy Dupuy, Olivier Gavet, Emmanuelle Caron, et Jean de Gunzburg. 2009. « Dynamic Changes in Rap1 Activity Are Required for Cell Retraction and Spreading during Mitosis ». *Journal of Cell Science* 122 (Pt 16): 2996-3004. <https://doi.org/10.1242/jcs.041301>.
- Dao, Vi Thuy, Aurélien Guy Dupuy, Olivier Gavet, Emmanuelle Caron, et Jean de Gunzburg. 2009. « Dynamic Changes in Rap1 Activity Are Required for Cell Retraction and Spreading during Mitosis ». *Journal of Cell Science* 122 (16): 2996-3004. <https://doi.org/10.1242/jcs.041301>.
- Dasbiswas, Kinjal, Shiqiong Hu, Frank Schnorrer, Samuel A. Safran, et Alexander D. Bershadsky. 2018. « Ordering of Myosin II Filaments Driven by Mechanical Forces: Experiments and Theory ». *Phil. Trans. R. Soc. B* 373 (1747): 20170114. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0114>.
- Davidson, S. M., et M. Morange. 2000. « Hsp25 and the P38 MAPK Pathway Are Involved in Differentiation of Cardiomyocytes ». *Developmental Biology* 218 (2): 146-60. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9596>.
- De Souza, Colin P. C., Kay A. O. Ellem, et Brian G. Gabrielli. 2000. « Centrosomal and Cytoplasmic Cdc2/Cyclin B1 Activation Precedes Nuclear Mitotic Events ». *Experimental Cell Research* 257 (1): 11-21. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4872>.
- Deakin, Nicholas O., et Christopher E. Turner. 2014. « Paxillin Inhibits HDAC6 to Regulate Microtubule Acetylation, Golgi Structure, and Polarized Migration ». *J Cell Biol* 206 (3): 395-413. <https://doi.org/10.1083/jcb.201403039>.
- Dehle, Francis C., Heath Ecroyd, Ian F. Musgrave, et John A. Carver. 2010. « AB-Crystallin Inhibits the Cell Toxicity Associated with Amyloid Fibril Formation by κ -Casein and the Amyloid- β Peptide ». *Cell Stress & Chaperones* 15 (6): 1013-26. <https://doi.org/10.1007/s12192-010-0212-z>.
- Delbecq, Scott P., Stefan Jehle, et Rachel Klevit. 2012. « Binding Determinants of the Small Heat Shock Protein, AB-crystallin: Recognition of the 'IXI' Motif ». *The EMBO Journal* 31 (24): 4587-94. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.318>.
- Delbecq, Scott P., et Rachel E. Klevit. 2013. « One size doesn't fit all: the oligomeric states of α B crystallin ». *FEBS letters* 587 (8). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.021>.
- Dephoure, Noah, Chunshui Zhou, Judit Villén, Sean A. Beausoleil, Corey E. Bakalarski, Stephen J. Elledge, et Steven P. Gygi. 2008. « A Quantitative Atlas of Mitotic Phosphorylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31): 10762-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805139105>.
- Disanza, Andrea, Marie-France Carlier, Theresia E. B. Stradal, Dominique Didry, Emanuela Frittoli, Stefano Confalonieri, Assunta Croce, Jurgen Wehland, Pier Paolo Di Fiore, et Giorgio Scita. 2004. « Eps8 Controls Actin-Based Motility by Capping the Barbed Ends of Actin Filaments ». *Nature Cell Biology* 6 (12): 1180-88. <https://doi.org/10.1038/ncb1199>.
- Dix, Christina L., Helen K. Matthews, Marina Uroz, Susannah McLaren, Lucie Wolf, Nicholas Heatley, Zaw Win, et al. 2018. « The Role of Mitotic Cell-Substrate Adhesion Re-modeling in Animal Cell Division ». *Developmental Cell* 45 (1): 132-145.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.03.009>.
- Diz-Muñoz, Alba, Daniel A. Fletcher, et Orion D. Weiner. 2013. « Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility ». *Trends in Cell Biology* 23 (2): 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.09.006>.
- Doong, H., J. Price, Y. S. Kim, C. Gasbarre, J. Probst, L. A. Liotta, J. Blanchette, K. Rizzo, et E. Kohn. 2000. « CAIR-1/BAG-3 Forms an EGF-Regulated Ternary Complex with Phospholipase C-Gamma and Hsp70/Hsc70 ». *Oncogene* 19 (38): 4385-95. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203797>.
- Dower, Christopher M., Carson A. Wills, Steven M. Frisch, et Hong-Gang Wang. 2018. « Mechanisms and context underlying the role of autophagy in cancer metastasis ». *Autophagy* 14 (7): 1110-28. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1450020>.
- Draetta, Giulio, Frank Luca, Joanne Westendorf, Leonardo Brizuela, Joan Ruderman, et David Beach. 1989. « cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: Evidence for proteolytic inactivation of MPF ». *Cell* 56 (5): 829-38. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90687-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90687-9).

- Du, Zhen-Xian, Hai-Yan Zhang, Xin Meng, Yan-Yan Gao, Ren-Long Zou, Bao-Qin Liu, Yifu Guan, et Hua-Qin Wang. 2009. « Proteasome Inhibitor MG132 Induces BAG3 Expression through Activation of Heat Shock Factor 1 ». *Journal of Cellular Physiology* 218 (3): 631-37. <https://doi.org/10.1002/jcp.21634>.
- Dubińska-Magiera, Magda, Jadwiga Jabłońska, Jolanta Saczko, Julita Kulbacka, Teresa Jagla, et Małgorzata Daczewska. 2014. « Contribution of Small Heat Shock Proteins to Muscle Development and Function ». *FEBS Letters* 588 (4): 517-30. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.01.005>.
- Dubnikov, Tatyana, Tziona Ben-Gedalya, et Ehud Cohen. 2017. « Protein Quality Control in Health and Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (3): a023523. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023523>.
- Ducommun, B, P Brambilla, M A Félix, B R Franza, E Karsenti, et G Draetta. 1991. « cdc2 phosphorylation is required for its interaction with cyclin. » *The EMBO Journal* 10 (11): 3311-19.
- Duijf, Pascal H. G., Nikolaus Schultz, et Robert Benezra. 2013. « Cancer Cells Preferentially Lose Small Chromosomes ». *International Journal of Cancer* 132 (10): 2316-26. <https://doi.org/10.1002/ijc.27924>.
- Duman, Joseph G., Shalaka Mulherkar, Yen-Kuei Tu, Jinxuan X. Cheng, et Kimberley F. Tolias. 2015. « Mechanisms for spatiotemporal regulation of Rho-GTPase signaling at synapses ». *Neuroscience Letters, Dendritic Spine Dysgenesis in Neuropsychiatric Disease*, 601 (août): 4-10. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.05.034>.
- Dumitru, Ana Maria G., Scott F. Rusin, Amber E. M. Clark, Arminja N. Kettenbach, et Duane A. Compton. 2017. « Cyclin A/Cdk1 Modulates Plk1 Activity in Prometaphase to Regulate Kinetochore-Microtubule Attachment Stability ». *ELife*. 20 novembre 2017. <https://doi.org/10.7554/eLife.29303>.
- Dumont, Sophie, et Timothy J. Mitchison. 2009. « Force and Length in the Mitotic Spindle ». *Current Biology* 19 (17): R749-61. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.07.028>.
- Dunlop, E. A., et A. R. Tee. 2014. « mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy ». *Seminars in Cell & Developmental Biology, Development of the urogenital system & mTOR Signalling & Tight Junctions in Health and Disease*, 36 (décembre): 121-29. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.006>.
- Dutertre, Stéphanie, Martine Cazales, Muriel Quaranta, Carine Froment, Valerie Trabut, Christine Dozier, Gladys Mirey, et al. 2004. « Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the Centrosome Contributes to the G2-M Transition ». *Journal of Cell Science* 117 (12): 2523-31. <https://doi.org/10.1242/jcs.01108>.
- Efimov, Andrey, Natalia Schiefermeier, Ilya Grigoriev, Michael C. Brown, Christopher E. Turner, J. Victor Small, et Irina Kaverina. 2008. « Paxillin-Dependent Stimulation of Microtubule Catastrophes at Focal Adhesion Sites ». *Journal of Cell Science* 121 (2): 196-204. <https://doi.org/10.1242/jcs.012666>.
- Ehrlicher, A. J., F. Nakamura, J. H. Hartwig, D. A. Weitz, et T. P. Stossel. 2011. « Mechanical Strain in Actin Networks Regulates FilGAP and Integrin Binding to Filamin A ». *Nature* 478 (7368): 260-63. <https://doi.org/10.1038/nature10430>.
- Ellis, R. John. 2006. « Molecular Chaperones: Assisting Assembly in Addition to Folding ». *Trends in Biochemical Sciences* 31 (7): 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2006.05.001>.
- Ellis, R. John. 2013. « Assembly chaperones: a perspective ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368 (1617). <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0398>.
- Elzen, Nicole den, et Jonathon Pines. 2001. « Cyclin a Is Destroyed in Prometaphase and Can Delay Chromosome Alignment and Anaphase ». *The Journal of Cell Biology* 153 (1): 121-36. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.1.121>.
- Eskelinen, Eeva-Liisa, Alan R. Prescott, Jennifer Cooper, Saskia M. Brachmann, Lijun Wang, Xiuwen Tang, Jonathan M. Backer, et John M. Lucocq. 2002. « Inhibition of Autophagy in Mitotic Animal Cells ». *Traffic* 3 (12): 878-93. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.31204.x>.
- Esue, Osigwe, Yiider Tseng, et Denis Wirtz. 2009. « α -Actinin and Filamin Cooperatively Enhance the Stiffness of Actin Filament Networks ». *PLOS ONE* 4 (2): e4411. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004411>.
- Evgrafov, Oleg V., Irena Mersyanova, Joy Irobi, Ludo Van Den Bosch, Ines Dierick, Conrad L. Leung, Olga Schagina, et al. 2004. « Mutant Small Heat-Shock Protein 27 Causes Axonal Charcot-Marie-Tooth Disease and Distal Hereditary Motor Neuropathy ». *Nature Genetics* 36 (6): 602-6. <https://doi.org/10.1038/ng1354>.

- Falco, A., M. Festa, A. Basile, A. Rosati, M. Pascale, F. Florenzano, S. L. Nori, et al. 2012. « BAG3 Controls Angiogenesis through Regulation of ERK Phosphorylation ». *Oncogene* 31 (50): 5153-61. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.17>.
- Fang, Xi, Julius Bogomolovas, Tongbin Wu, Wei Zhang, Canzhao Liu, Jennifer Veevers, Matthew J. Stroud, et al. 2017. « Loss-of-Function Mutations in Co-Chaperone BAG3 Destabilize Small HSPs and Cause Cardiomyopathy ». *The Journal of Clinical Investigation* 127 (8): 3189-3200. <https://doi.org/10.1172/JCI94310>.
- Fehon, Richard G., Andrea I. McClatchey, et Anthony Bretscher. 2010. « Organizing the Cell Cortex: The Role of ERM Proteins ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (4): 276-87. <https://doi.org/10.1038/nrm2866>.
- Feng, Yuchen, Ding He, Zhiyuan Yao, et Daniel J. Klionsky. 2014. « The Machinery of Macroautophagy ». *Cell Research* 24 (1): 24-41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>.
- Ferrari, S. 2006. « Protein Kinases Controlling the Onset of Mitosis ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63 (7): 781-95. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5515-3>.
- Ferreira, Jorge G., António J. Pereira, Anna Akhmanova, et Helder Maiato. 2013. « Aurora B Spatially Regulates EB3 Phosphorylation to Coordinate Daughter Cell Adhesion with Cytokinesis ». *J Cell Biol* 201 (5): 709-24. <https://doi.org/10.1083/jcb.201301131>.
- Fink, Jenny, Nicolas Carpi, Timo Betz, Angélique Bétard, Meriem Chebah, Ammar Azioune, Michel Bornens, et al. 2011. « External Forces Control Mitotic Spindle Positioning ». *Nature Cell Biology* 13 (7): 771-78. <https://doi.org/10.1038/ncb2269>.
- Fischer-Friedrich, Elisabeth, Yusuke Toyoda, Cedric J. Cattin, Daniel J. Müller, Anthony A. Hyman, et Frank Jülicher. 2016. « Rheology of the Active Cell Cortex in Mitosis ». *Biophysical Journal* 111 (3): 589-600. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.06.008>.
- Foley, Emily A., et Tarun M. Kapoor. 2013. « Microtubule Attachment and Spindle Assembly Checkpoint Signalling at the Kinetochores ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (1): 25-37. <https://doi.org/10.1038/nrm3494>.
- Fontana, Rosa, et Maria Vivo. 2018. « Dynamics of p14ARF and Focal Adhesion Kinase-Mediated Autophagy in Cancer ». *Cancers* 10 (7). <https://doi.org/10.3390/cancers10070221>.
- Fontanella, Bianca, Leila Birolo, Giuseppe Infusini, Claudia Cirulli, Liberato Marzullo, Pietro Pucci, Maria Caterina Turco, et Alessandra Tosco. 2010. « The co-chaperone BAG3 interacts with the cytosolic chaperonin CCT: New hints for actin folding ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (5): 641-50. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.008>.
- Franceschelli, Silvia, Alessandra Rosati, Rosa Lerosé, Serena De Nicola, Maria Caterina Turco, et Maria Pascale. 2008. « Bag3 Gene Expression Is Regulated by Heat Shock Factor 1 ». *Journal of Cellular Physiology* 215 (3): 575-77. <https://doi.org/10.1002/jcp.21397>.
- Franck, Erik, Ole Madsen, Teun van Rheede, Guénola Ricard, Martijn A. Huynen, et Wilfried W. de Jong. 2004. « Evolutionary Diversity of Vertebrate Small Heat Shock Proteins ». *Journal of Molecular Evolution* 59 (6): 792-805. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0013-z>.
- Frank, Derk, Christian Kuhn, Hugo A. Katus, et Norbert Frey. 2006. « The Sarcomeric Z-Disc: A Nodal Point in Signalling and Disease ». *Journal of Molecular Medicine* 84 (6): 446. <https://doi.org/10.1007/s00109-005-0033-1>.
- Friedland, Julie C., Mark H. Lee, et David Boettiger. 2009. « Mechanically Activated Integrin Switch Controls A5β1 Function ». *Science* 323 (5914): 642-44. <https://doi.org/10.1126/science.1168441>.
- Fuchs, Margit, Carole Luthold, Solenn M. Guilbert, Alice Anaïs Varlet, Herman Lambert, Alexandra Jetté, Sabine Elowe, Jacques Landry, et Josée N. Lavoie. 2015. « A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis ». *PLoS Genetics* 11 (10): 1-32. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005582>.
- Fuchs, Margit, Dominic J. Poirier, Samuel J. Seguin, Herman Lambert, Serena Carra, Steve J. Charette, et Jacques Landry. 2010. « Identification of the Key Structural Motifs Involved in HspB8/HspB6-Bag3 Interaction ». *Biochemical Journal* 425 (1): 245-57. <https://doi.org/10.1042/BJ20090907>.
- Fukumoto, Miki, Shusaku Kurisu, Tesshi Yamada, et Tadaomi Takenawa. 2015. « α-Actinin-4 Enhances Colorectal Cancer Cell Invasion by Suppressing Focal Adhesion Maturation ». *PLoS ONE* 10 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120616>.
- Furuno, Nobuaki, Nicole den Elzen, et Jonathon Pines. 1999. « Human Cyclin a Is Required for Mitosis until Mid Prophase ». *The Journal of Cell Biology* 147 (2): 295-306. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.2.295>.

- Furuya, Tsuyoshi, Minsu Kim, Marta Lipinski, Juying Li, Dohoon Kim, Tao Lu, Yong Shen, et al. 2010. « Negative Regulation of Vps34 by Cdk Mediated Phosphorylation ». *Molecular Cell* 38 (4): 500-511. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.009>.
- Galavotti, S., S. Bartesaghi, D. Faccenda, M. Shaked-Rabi, S. Sanzone, A. McEvoy, D. Dinsdale, et al. 2013. « The Autophagy-Associated Factors DRAM1 and P62 Regulate Cell Migration and Invasion in Glioblastoma Stem Cells ». *Oncogene* 32 (6): 699-712. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.111>.
- Gamerding, Martin, Serena Carra, et Christian Behl. 2011. « Emerging Roles of Molecular Chaperones and Co-Chaperones in Selective Autophagy: Focus on BAG Proteins ». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 89 (12): 1175-82. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0795-6>.
- Gamerding, Martin, Parvana Hajieva, A. Murat Kaya, Uwe Wolfrum, F. Ulrich Hartl, et Christian Behl. 2009. « Protein Quality Control during Aging Involves Recruitment of the Macroautophagy Pathway by BAG3 ». *The EMBO Journal* 28 (7): 889-901. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.29>.
- Gamerding, Martin, A Murat Kaya, Uwe Wolfrum, Albrecht M Clement, et Christian Behl. 2011. « BAG3 Mediates Chaperone-Based Aggresome-Targeting and Selective Autophagy of Misfolded Proteins ». *EMBO Reports* 12 (2): 149-56. <https://doi.org/10.1038/embor.2010.203>.
- Garrido, C., C. Paul, R. Seigneuric, et H. H. Kampinga. 2012. « The Small Heat Shock Proteins Family: The Long Forgotten Chaperones ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44 (10): 1588-92. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.02.022>.
- Gautier, Jean, Jeremy Minshull, Manfred Lohka, Michael Glotzer, Tim Hunt, et James L. Maller. 1990. « Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus* ». *Cell* 60 (3): 487-94. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90599-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90599-A).
- Gavet, Olivier, et Jonathon Pines. 2010. « Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to Mitosis ». *Developmental Cell* 18 (4): 533-43. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.02.013>.
- Geiger, Tamar, et Ronen Zaidel-Bar. 2012. « Opening the floodgates: proteomics and the integrin adhesome ». *Current Opinion in Cell Biology, Cell-to-cell contact and extracellular matrix*, 24 (5): 562-68. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.05.004>.
- Gentilella, Antonio, et Kamel Khalili. 2010. « BAG3 expression is sustained by FGF2 in neural progenitor cells and impacts cell proliferation ». *Cell Cycle* 9 (20): 4245-47. <https://doi.org/10.4161/cc.9.20.13517>.
- Georgatos, S. D., A. Pyrpasopoulou, et P. A. Theodoropoulos. 1997. « Nuclear Envelope Breakdown in Mammalian Cells Involves Stepwise Lamina Disassembly and Microtubule-Drive Deformation of the Nuclear Membrane ». *Journal of Cell Science* 110 (17): 2129-40.
- Gheghiani, Lilia, Damarys Loew, Bérangère Lombard, Jörg Mansfeld, et Olivier Gavet. 2017. « PLK1 Activation in Late G2 Sets Up Commitment to Mitosis ». *Cell Reports* 19 (10): 2060-73. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.031>.
- Giese, Kim C., et Elizabeth Vierling. 2002. « Changes in Oligomerization Are Essential for the Chaperone Activity of a Small Heat Shock Protein in Vivo and in Vitro ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (48): 46310-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208926200>.
- Giese, Kim C., et Elizabeth Vierling. 2004. « Mutants in a Small Heat Shock Protein That Affect the Oligomeric State ANALYSIS AND ALLELE-SPECIFIC SUPPRESSION ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (31): 32674-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404455200>.
- Godek, Kristina M., Lilian Kabeche, et Duane A. Compton. 2015. « Regulation of Kinetochore–Microtubule Attachments through Homeostatic Control during Mitosis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (1): 57-64. <https://doi.org/10.1038/nrm3916>.
- Golan, Amnon, Yana Yudkovsky, et Avram Hershko. 2002. « The Cyclin-Ubiquitin Ligase Activity of Cyclosome/APC Is Jointly Activated by Protein Kinases Cdk1-Cyclin B and Plk ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (18): 15552-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111476200>.
- Golenhofen, Nikola, et Britta Bartelt-Kirbach. 2016. « The Impact of Small Heat Shock Proteins (HspBs) in Alzheimer's and Other Neurological Diseases ». *Current Pharmaceutical Design* 22 (26): 4050-62.
- Goley, Erin D., et Matthew D. Welch. 2006. « The ARP2/3 Complex: An Actin Nucleator Comes of Age ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7 (10): 713-26. <https://doi.org/10.1038/nrm2026>.
- Gong, Delquin, Joseph R. Pomerening, Jason W. Myers, Christer Gustavsson, Joshua T. Jones, Angela T. Hahn, Tobias Meyer, et James E. Ferrell. 2007. « Cyclin A2 Regulates Nuclear-Envelope Breakdown and the Nuclear Accumulation of Cyclin B1 ». *Current Biology* 17 (1): 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.066>.

- Guilbert, Solenn M., Herman Lambert, Marc-Antoine Rodrigue, Margit Fuchs, Jacques Landry, et Josée N. Lavoie. 2018. « HSPB8 and BAG3 cooperate to promote spatial sequestration of ubiquitinated proteins and coordinate the cellular adaptive response to proteasome insufficiency ». *The FASEB Journal*, février, fj.201700558RR. <https://doi.org/10.1096/fj.201700558RR>.
- Guilbert, Solenn M., Alice Anaïs Varlet, Margit Fuchs, Herman Lambert, Jacques Landry, et Josée N. Lavoie. 2015. « Regulation of Actin-Based Structure dynamics by HspB Proteins and Partners ».
- Gullberg, Mats, et Ann-Catrin Andersson. 2010. « Visualization and Quantification of Protein-Protein Interactions in Cells and Tissues ». *Nature Methods | Application Notes*, juin. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.306>.
- Haggarty, Stephen J., Kathryn M. Koeller, Jason C. Wong, Christina M. Grozinger, et Stuart L. Schreiber. 2003. « Domain-Selective Small-Molecule Inhibitor of Histone Deacetylase 6 (HDAC6)-Mediated Tubulin Deacetylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (8): 4389-94. <https://doi.org/10.1073/pnas.0430973100>.
- Hagting, Anja, Mark Jackman, Karen Simpson, et Jonathon Pines. 1999. « Translocation of Cyclin B1 to the Nucleus at Prophase Requires a Phosphorylation-Dependent Nuclear Import Signal ». *Current Biology* 9 (13): 680-89. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80308-X](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80308-X).
- Hall, A. 2005. « Rho GTPases and the Control of Cell Behaviour ». *Biochemical Society Transactions* 33 (5): 891-95. <https://doi.org/10.1042/BST0330891>.
- Hamouda, Mohamed-Amine, Nathalie Belhacene, Alexandre Puissant, Pascal Colosetti, Guillaume Robert, Arnaud Jacquet, Bernard Mari, Patrick Auberger, et Frederic Luciano. 2014. « The Small Heat Shock Protein B8 (HSPB8) Confers Resistance to Bortezomib by Promoting Autophagic Removal of Misfolded Proteins in Multiple Myeloma Cells ». *Oncotarget* 5 (15): 6252-66. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2193>.
- Hara, Masatoshi, Yusuke Abe, Toshiaki Tanaka, Takayoshi Yamamoto, Eiichi Okumura, et Takeo Kishimoto. 2012. « Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase-promoting factor ». *Nature Communications* 3 (septembre): 1059. <https://doi.org/10.1038/ncomms2062>.
- Hartl, F. Ulrich. 2016. « Cellular Homeostasis and Aging ». *Annual Review of Biochemistry* 85 (1): 1-4. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-011116-110806>.
- Hartl, F. Ulrich. 2017. « Protein Misfolding Diseases ». *Annual Review of Biochemistry* 86 (juin): 21-26. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044518>.
- Haslbeck, Martin, et Elizabeth Vierling. 2015. « A First Line of Stress Defense: Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis ». *Journal of Molecular Biology, Molecular Chaperones and Protein Quality Control (Part I)*, 427 (7): 1537-48. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.02.002>.
- Hayes, David, Vanessa Napoli, Andrew Mazurkie, Walter F. Stafford, et Philip Graceffa. 2009. « Phosphorylation Dependence of Hsp27 Multimeric Size and Molecular Chaperone Function ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (28): 18801-7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.011353>.
- Heim, Andreas, Anja Konietzny, et Thomas U. Mayer. 2015. « Protein Phosphatase 1 Is Essential for Greatwall Inactivation at Mitotic Exit ». *EMBO Reports* 16 (11): 1501-10. <https://doi.org/10.15252/embr.201540876>.
- Hein, Marco Y., Nina C. Hubner, Ina Poser, Jürgen Cox, Nagarjuna Nagaraj, Yusuke Toyoda, Igor A. Gak, et al. 2015. « A Human Interactome in Three Quantitative Dimensions Organized by Stoichiometries and Abundances ». *Cell* 163 (3): 712-23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.053>.
- Henderson, Christine A., Christopher G. Gomez, Stefanie M. Novak, Lei Mi-Mi, et Carol C. Gregorio. 2017. « Overview of the Muscle Cytoskeleton ». *Comprehensive Physiology* 7 (3): 891-944. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160033>.
- Heng, Yi-Wen, et Cheng-Gee Koh. 2010. « Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (10): 1622-33. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.04.007>.
- Hershko, Avram, et Aaron Ciechanover. 1998. « The Ubiquitin System ». *Annual Review of Biochemistry* 67 (1): 425-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>.
- Hirota, Toru, Naoko Kunitoku, Takashi Sasayama, Tomotoshi Marumoto, Dongwei Zhang, Masayuki Nitta, Katsuyoshi Hatakeyama, et Hideyuki Saya. 2003. « Aurora-A and an Interacting Activator, the LIM Protein Ajuba, Are Required for Mitotic Commitment in Human Cells ». *Cell* 114 (5): 585-98. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00642-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00642-1).
- Hishiya, Akinori, Toshio Kitazawa, et Shinichi Takayama. 2010. « BAG3 and Hsc70 Interact With Actin Capping Protein CapZ to Maintain Myofibrillar Integrity Under Mechanical Stress Novelty and

- Significance ». *Circulation Research* 107 (10): 1220-31. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.225649>.
- Hoffman, Laura, Christopher C. Jensen, Masaaki Yoshigi, Mary Beckerle, et Valerie Marie Weaver. 2017. « Mechanical signals activate p38 MAPK pathway-dependent reinforcement of actin via mechanosensitive HspB1 ». *Molecular Biology of the Cell* 28 (20): 2661-75. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-02-0087>.
- Homma, Sachiko, Masahiro Iwasaki, G. Diane Shelton, Eva Engvall, John C. Reed, et Shinichi Takayama. 2006. « BAG3 Deficiency Results in Fulminant Myopathy and Early Lethality ». *The American Journal of Pathology* 169 (3): 761-73. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060250>.
- Hong, Jin, Jun-Sub Park, Hyun Lee, Jaemin Jeong, Hye Hyeon Yun, Hye Yun Kim, Young-Gyu Ko, et Jeong-Hwa Lee. 2016. « Myosin heavy chain is stabilized by BCL-2 interacting cell death suppressor (BIS) in skeletal muscle ». *Experimental & Molecular Medicine* 48 (4): e225. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.2>.
- Horn, Robert D. Van, Shaoyou Chu, Li Fan, Tinggui Yin, Jian Du, Richard Beckmann, Mary Mader, et al. 2010. « Cdk1 Activity Is Required for Mitotic Activation of Aurora A during G2/M Transition of Human Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (28): 21849-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141010>.
- Houslay, Miles D., et Frank Christian. 2010. « P62 (SQSTM1) Forms Part of a Novel, Reversible Aggregate Containing a Specific Conformer of the CAMP Degrading Phosphodiesterase, PDE4A4 ». *Autophagy* 6 (8): 1198-1200. <https://doi.org/10.4161/auto.6.8.13479>.
- Hu, Zhiping, Lan Chen, Jie Zhang, Ting Li, Jianguang Tang, Niangui Xu, et Xiang Wang. 2007. « Structure, Function, Property, and Role in Neurologic Diseases and Other Diseases of the SHsp22 ». *Journal of Neuroscience Research* 85 (10): 2071-79. <https://doi.org/10.1002/jnr.21231>.
- Hubbert, Charlotte, Amaris Guardiola, Rong Shao, Yoshiharu Kawaguchi, Akihiro Ito, Andrew Nixon, Minoru Yoshida, Xiao-Fan Wang, et Tso-Pang Yao. 2002. « HDAC6 Is a Microtubule-Associated Deacetylase ». *Nature* 417 (6887): 455-58. <https://doi.org/10.1038/417455a>.
- Hunt, T. 1989. « Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase ». *Current Opinion in Cell Biology* 1 (2): 268-74. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(89\)90099-9](https://doi.org/10.1016/0955-0674(89)90099-9).
- Ichimura, Yoshinobu, et Masaaki Komatsu. 2010. « Selective degradation of p62 by autophagy ». *Seminars in Immunopathology* 32 (4): 431-36. <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0220-1>.
- Ichimura, Yoshinobu, Eiki Kominami, Keiji Tanaka, et Masaaki Komatsu. 2008. « Selective turnover of p62/A170/SQSTM1 by autophagy ». *Autophagy* 4 (8): 1063-66. <https://doi.org/10.4161/auto.6826>.
- Ichimura, Yoshinobu, Taichi Kumanomidou, Yu-shin Sou, Tsunehiro Mizushima, Junji Ezaki, Takashi Ueno, Eiki Kominami, Takashi Yamane, Keiji Tanaka, et Masaaki Komatsu. 2008. « Structural Basis for Sorting Mechanism of P62 in Selective Autophagy ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (33): 22847-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802182200>.
- Ichimura, Yoshinobu, Satoshi Waguri, Yu-shin Sou, Shun Kageyama, Jun Hasegawa, Ryosuke Ishimura, Tetsuya Saito, et al. 2013. « Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy ». *Molecular Cell* 51 (5): 618-31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.003>.
- Ikeda, Fumiyo, et Ivan Dikic. 2008. « Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series ». *EMBO Reports* 9 (6): 536-42. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.93>.
- Iorio, V., M. Festa, A. Rosati, M. Hahne, C. Tiberti, M. Capunzo, V. De Laurenzi, et M. C. Turco. 2015. « BAG3 Regulates Formation of the SNARE Complex and Insulin Secretion ». *Cell Death & Disease* 6 (3): e1684. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.53>.
- Irobi, Joy, Katrien Van Impe, Pavel Seeman, Alben Jordanova, Ines Dierick, Nathalie Verpoorten, Andrej Michalik, et al. 2004. « Hot-Spot Residue in Small Heat-Shock Protein 22 Causes Distal Motor Neuropathy ». *Nature Genetics* 36 (6): 597-601. <https://doi.org/10.1038/ng1328>.
- Ishii, Tetsuro, Ken Itoh, Satoru Takahashi, Hideyo Sato, Toru Yanagawa, Yasutake Katoh, Shiro Bannai, et Masayuki Yamamoto. 2000. « Transcription Factor Nrf2 Coordinately Regulates a Group of Oxidative Stress-Inducible Genes in Macrophages ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (21): 16023-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.21.16023>.
- Isogai, Tadamoto, Rob van der Kammen, Daniela Leyton-Puig, Katarzyna M. Kedziora, Kees Jalink, et Metello Innocenti. 2015. « Initiation of Lamellipodia and Ruffles Involves Cooperation between MDial and the Arp2/3 Complex ». *J Cell Sci* 128 (20): 3796-3810. <https://doi.org/10.1242/jcs.176768>.

- Itakura, Eisuke, et Noboru Mizushima. 2011. « P62 Targeting to the Autophagosome Formation Site Requires Self-Oligomerization but Not LC3 Binding ». *The Journal of Cell Biology* 192 (1): 17-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009067>.
- Iwasaki, Masahiro, Sachiko Homma, Akinori Hishiya, Samuel J. Dolezal, John C. Reed, et Shinichi Takayama. 2007. « BAG3 Regulates Motility and Adhesion of Epithelial Cancer Cells ». *Cancer Research* 67 (21): 10252-59. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0618>.
- Iwasaki, Masahiro, Ryoichi Tanaka, Akinori Hishiya, Sachiko Homma, John C. Reed, et Shinichi Takayama. 2010. « BAG3 directly associates with guanine nucleotide exchange factor of Rap1, PDZGEF2, and regulates cell adhesion ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 400 (3): 413-18. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.08.092>.
- Jaarsveld, Richard H. van, et Geert J. P. L. Kops. 2016. « Difference Makers: Chromosomal Instability versus Aneuploidy in Cancer ». *Trends in Cancer* 2 (10): 561-71. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.09.003>.
- Jacquemet, Guillaume, et Johanna Ivaska. 2018. « Mitosis-Resistant Adhesions Provide Molecular Memory to Dividing Cells ». *Developmental Cell* 45 (1): 5-7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.03.015>.
- Jain, Ashish, Trond Lamark, Eva Sjøttem, Kenneth Bowitz Larsen, Jane Atesoh Awuh, Aud Øvervatn, Michael McMahon, John D. Hayes, et Terje Johansen. 2010. « P62/SQSTM1 Is a Target Gene for Transcription Factor NRF2 and Creates a Positive Feedback Loop by Inducing Antioxidant Response Element-Driven Gene Transcription ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (29): 22576-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118976>.
- Jaka, Oihane, Leire Casas-Fraile, Adolfo López de Munain, et Amets Sáenz. 2015. « Costamere Proteins and Their Involvement in Myopathic Processes ». *Expert Reviews in Molecular Medicine* 17. <https://doi.org/10.1017/erm.2015.9>.
- Jakob, U., M. Gaestel, K. Engel, et J. Buchner. 1993. « Small Heat Shock Proteins Are Molecular Chaperones. » *Journal of Biological Chemistry* 268 (3): 1517-20.
- Janke, Carsten, et Guillaume Montagnac. 2017. « Causes and Consequences of Microtubule Acetylation ». *Current Biology* 27 (23): R1287-92. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.044>.
- Jeong, Ae Lee, et Young Yang. 2013. « PP2A function toward mitotic kinases and substrates during the cell cycle ». *BMB Reports* 46 (6): 289-94. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2013.46.6.041>.
- Johansen, Terje, et Trond Lamark. 2011. « Selective Autophagy Mediated by Autophagic Adapter Proteins ». *Autophagy* 7 (3): 279-96.
- Johnston, J. A., C. L. Ward, et R. R. Kopito. 1998. « Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins ». *The Journal of Cell Biology* 143 (7): 1883-98.
- Jones, Matthew C., Janet A. Askari, Jonathan D. Humphries, et Martin J. Humphries. 2018. « Cell Adhesion Is Regulated by CDK1 during the Cell Cycle ». *J Cell Biol*, juin, jcb.201802088. <https://doi.org/10.1083/jcb.201802088>.
- Jong, De, W. W., J. A. Leunissen, et C. E. Voorter. 1993. « Evolution of the Alpha-Crystallin/Small Heat-Shock Protein Family. » *Molecular Biology and Evolution* 10 (1): 103-26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a039992>.
- Jong, Wilfried W. de, Gert-Jan Caspers, et Jack A. M. Leunissen. 1998. « Genealogy of the α -crystallin—small heat-shock protein superfamily ». *International Journal of Biological Macromolecules* 22 (3): 151-62. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(98\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(98)00013-0).
- Josefsberg, L. B., D. Galiani, A. Dantes, A. Amsterdam, et N. Dekel. 2000. « The Proteasome Is Involved in the First Metaphase-to-Anaphase Transition of Meiosis in Rat Oocytes ». *Biology of Reproduction* 62 (5): 1270-77.
- Joukov, Vladimir, et Arcangela De Nicolo. 2018. « Aurora-PLK1 Cascades as Key Signaling Modules in the Regulation of Mitosis ». *Sci. Signal.* 11 (543): eaar4195. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aar4195>.
- Joung, Insil, Jack L. Strominger, et Jaekyoon Shin. 1996. « Molecular Cloning of a Phosphotyrosine-Independent Ligand of the p56lck SH2 Domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (12): 5991-95.
- Jung, Seung Eun, Yong Kwan Kim, Dong-Ye Youn, Mi-Hyun Lim, Jeong Heon Ko, Young Soo Ahn, et Jeong-Hwa Lee. 2010. « Down-modulation of Bis sensitizes cell death in C6 glioma cells induced by oxygen–glucose deprivation ». *Brain Research* 1349 (aout): 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.06.043>.

- Kabeche, Lilian, et Duane A. Compton. 2013. « Cyclin A Regulates Kinetochores Microtubules to Promote Faithful Chromosome Segregation ». *Nature* 502 (7469): 110-13. <https://doi.org/10.1038/nature12507>.
- Kai, FuiBoon, James P. Fawcett, Roy Duncan, FuiBoon Kai, James P. Fawcett, et Roy Duncan. 2015. « Synaptopodin-2 induces assembly of peripheral actin bundles and immature focal adhesions to promote lamellipodia formation and prostate cancer cell migration ». *Oncotarget* 6 (13): 11162-74. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3578>.
- Kaluza, David, Jens Kroll, Sabine Gesierich, Tso-Pang Yao, Reinier A. Boon, Eduard Hergenreider, Marc Tjwa, et al. 2011. « Class IIb HDAC6 Regulates Endothelial Cell Migration and Angiogenesis by Deacetylation of Cortactin ». *The EMBO Journal* 30 (20): 4142-56. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.298>.
- Kalwat, Michael A., et Debbie C. Thurmond. 2013. « Signaling Mechanisms of Glucose-Induced F-Actin Remodeling in Pancreatic Islet β Cells ». *Experimental & Molecular Medicine* 45 (8): e37. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.73>.
- Kappé, G., P. Verschuure, R. L. Philipsen, A. A. Staalduinen, P. Van de Boogaart, W. C. Boelens, et W. W. De Jong. 2001. « Characterization of Two Novel Human Small Heat Shock Proteins: Protein Kinase-Related HspB8 and Testis-Specific HspB9 ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1520 (1): 1-6.
- Kappé, Guido, Erik Franck, Pauline Verschuure, Wilbert C. Boelens, Jack A. M. Leunissen, et Wilfried W. de Jong. 2003. « The human genome encodes 10 α -crystallin-related small heat shock proteins: HspB1-10 ». *Cell Stress & Chaperones* 8 (1): 53-61.
- Kassis, Jareer N., Elizabeth A. Guancial, Howard Doong, Victoria Virador, et Elise C. Kohn. 2006. « CAIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins ». *Experimental Cell Research* 312 (15): 2962-71. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.05.023>.
- Kathage, Barbara, Sebastian Gehlert, Anna Ulbricht, Laura Lüdecke, Victor E. Tapia, Zacharias Orfanos, Daniela Wenzel, et al. 2017. « The Chaperone BAG3 Coordinates Protein Synthesis and Autophagy under Mechanical Strain through Spatial Regulation of MTORC1 ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1864 (1): 62-75. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.007>.
- Katsuragi, Yoshinori, Yoshinobu Ichimura, et Masaaki Komatsu. 2016. « Regulation of the Keap1-Nrf2 pathway by p62/SQSTM1 ». *Current Opinion in Toxicology, Oxidative Toxicology*, 1 (décembre): 54-61. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2016.09.005>.
- Kawaguchi, Yoshiharu, Jeffrey J Kovacs, Adam McLaurin, Jeffery M Vance, Akihiro Ito, et Tso-Pang Yao. 2003. « The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress ». *Cell* 115 (6): 727-38. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00939-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00939-5).
- Ke, Lei, Roelien A. M. Meijering, Femke Hoogstra-Berends, Katarina Mackovicova, Michel J. Vos, Isabelle C. Van Gelder, Robert H. Henning, Harm H. Kampinga, et Bianca J. J. M. Brundel. 2011. « HSPB1, HSPB6, HSPB7 and HSPB8 Protect against RhoA GTPase-Induced Remodeling in Tachypaced Atrial Myocytes ». *PloS One* 6 (6): e20395. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020395>.
- Kenific, Candia M., Samantha J. Stehens, Juliet Goldsmith, Andrew M. Leidal, Nathalie Faure, Jordan Ye, Torsten Wittmann, et Jayanta Debnath. 2016. « NBR1 Enables Autophagy-Dependent Focal Adhesion Turnover ». *J Cell Biol* 212 (5): 577-90. <https://doi.org/10.1083/jcb.201503075>.
- Kernan, Jennifer, Thomas Bonacci, et Michael J. Emanuele. 2018. « Who guards the guardian? Mechanisms that restrain APC/C during the cell cycle ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1865 (12): 1924-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.09.011>.
- Kettenbach, Arminja N., Devin K. Schweppe, Brendan K. Faherty, Dov Pechenick, Alexandre A. Pletnev, et Scott A. Gerber. 2011. « Quantitative Phosphoproteomics Identifies Substrates and Functional Modules of Aurora and Polo-Like Kinase Activities in Mitotic Cells ». *Sci. Signal.* 4 (179): rs5-rs5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001497>.
- Kettern, Nadja, Michael Dreiseidler, Riga Tawo, et Jörg Höfeld. 2010. « Chaperone-Assisted Degradation: Multiple Paths to Destruction ». *Biological Chemistry* 391 (5): 481-89. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.058>.
- Kiani, Farooq Ahmad, et Stefan Fischer. 2016. « ATP-Dependent Interplay between Local and Global Conformational Changes in the Myosin Motor ». *Cytoskeleton* 73 (11): 643-51. <https://doi.org/10.1002/cm.21333>.

- Kim, Hugh, et Christopher A. McCulloch. 2011. « Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion ». *FEBS Letters* 585 (1): 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.11.033>.
- Kim, Hye Yun, Yong-Sam Kim, Hye Hyeon Yun, Chang-Nim Im, Jeong-Heon Ko, et Jeong-Hwa Lee. 2016. « ERK-mediated phosphorylation of BIS regulates nuclear translocation of HSF1 under oxidative stress ». *Experimental & Molecular Medicine* 48 (9): e260. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.84>.
- Kim, Hyun-Soo, Gary Fernandes, et Chang-Woo Lee. 2016. « Protein Phosphatases Involved in Regulating Mitosis: Facts and Hypotheses ». *Molecules and Cells* 39 (9): 654-62. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0214>.
- Kim, K. K., R. Kim, et S. H. Kim. 1998. « Crystal Structure of a Small Heat-Shock Protein ». *Nature* 394 (6693): 595-99. <https://doi.org/10.1038/29106>.
- Kim, Maria. 2004. « The Problem of Protein Kinase Activity of Small Heat Shock Protein Hsp22 (H11 or HspB8) ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325 (3): 649-52. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.074>.
- Kim, Maria V., Alexei S. Kasakov, Alim S. Seit-Nebi, Steven B. Marston, et Nikolai B. Gusev. 2006. « Structure and Properties of K141E Mutant of Small Heat Shock Protein HSP22 (HspB8, H11) That Is Expressed in Human Neuromuscular Disorders ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 454 (1): 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.07.014>.
- Kim, Yujin E., Mark S. Hipp, Andreas Bracher, Manajit Hayer-Hartl, et F. Ulrich Hartl. 2013. « Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis ». *Annual Review of Biochemistry* 82: 323-55. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060208-092442>.
- King, Michael, Firoozeh Nafar, Joseph Clarke, et Karen Mearow. 2009. « The Small Heat Shock Protein Hsp27 Protects Cortical Neurons against the Toxic Effects of Beta-Amyloid Peptide ». *Journal of Neuroscience Research* 87 (14): 3161-75. <https://doi.org/10.1002/jnr.22145>.
- Kirkin, Vladimir, David G. McEwan, Ivana Novak, et Ivan Dikic. 2009. « A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy ». *Molecular Cell* 34 (3): 259-69. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.04.026>.
- Klionsky, Daniel J., Kotb Abdelmohsen, Akihisa Abe, Md Joynal Abedin, Hagai Abeliovich, Abraham Acevedo Arozena, Hiroaki Adachi, et al. 2016. « Guidelines for the Use and Interpretation of Assays for Monitoring Autophagy (3rd Edition) ». *Autophagy* 12 (1): 1-222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>.
- Knezevic, Tijana, Valerie D. Myers, Jennifer Gordon, Douglas G. Tilley, Thomas E. Sharp, JuFang Wang, Kamel Khalili, Joseph Y. Cheung, et Arthur M. Feldman. 2015. « BAG3: A New Player in the Heart Failure Paradigm ». *Heart Failure Reviews* 20 (4): 423-34. <https://doi.org/10.1007/s10741-015-9487-6>.
- Knöll, Ralph, Byambajav Buyandelger, et Max Lab. 2011. « The Sarcomeric Z-Disc and Z-Discopathies ». Research article. BioMed Research International. 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/569628>.
- Koenderink, Gijssje H, et Ewa K Paluch. 2018. « Architecture shapes contractility in actomyosin networks ». *Current Opinion in Cell Biology, Cell Architecture*, 50 (février): 79-85. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.01.015>.
- Koh, Ara, Dohyun Park, Heeyoon Jeong, Jiyoun Lee, Mi Nam Lee, Pann-Ghill Suh, et Sung Ho Ryu. 2014. « Regulation of C1-Ten Protein Tyrosine Phosphatase by P62/SQSTM1-Mediated Sequestration and Degradation ». *Cellular Signalling* 26 (11): 2470-80. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.033>.
- Komander, David, et Michael Rape. 2012. « The Ubiquitin Code ». *Annual Review of Biochemistry* 81 (1): 203-29. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060310-170328>.
- Komatsu Masaaki, et Ichimura Yoshinobu. 2010. « Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy ». *FEBS Letters* 584 (7): 1374-78. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.017>.
- Komatsu, Masaaki, et Yoshinobu Ichimura. 2010. « Selective Autophagy Regulates Various Cellular Functions ». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 15 (9): 923-33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01433.x>.
- Komatsu, Masaaki, Hirofumi Kurokawa, Satoshi Waguri, Keiko Taguchi, Akira Kobayashi, Yoshinobu Ichimura, Yu-Shin Sou, et al. 2010. « The Selective Autophagy Substrate P62 Activates the Stress Responsive Transcription Factor Nrf2 through Inactivation of Keap1 ». *Nature Cell Biology* 12 (3): 213-23. <https://doi.org/10.1038/ncb2021>.
- Komatsu, Masaaki, Satoshi Waguri, Masato Koike, Yu-shin Sou, Takashi Ueno, Taichi Hara, Noboru Mizushima, et al. 2007. « Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body

- Formation in Autophagy-Deficient Mice ». *Cell* 131 (6): 1149-63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.035>.
- Konersman, Chamindra G., Brett J. Bordini, Gunter Scharer, Michael W. Lawlor, Steven Zangwill, James F. Southern, Louella Amos, Gabrielle C. Geddes, Robert Kliegman, et Michael P. Collins. 2015. « BAG3 Myofibrillar Myopathy Presenting with Cardiomyopathy ». *Neuromuscular Disorders* 25 (5): 418-22. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2015.01.009>.
- Kopito, Ron R. 2000. « Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation ». *Trends in Cell Biology* 10 (12): 524-30. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01852-3](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01852-3).
- Kostera-Pruszczyk, Anna, Małgorzata Suszek, Rafał Płoski, Maria Franaszczyk, Anna Potulska-Chromik, Piotr Pruszczyk, Elżbieta Sadurska, Justyna Karolczak, Anna M. Kamińska, et Maria Jolanta Rędownicz. 2015. « BAG3-Related Myopathy, Polyneuropathy and Cardiomyopathy with Long QT Syndrome ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 36 (6): 423-32. <https://doi.org/10.1007/s10974-015-9431-3>.
- Kotak, Sachin, Coralie Busso, et Pierre Gönczy. 2012. « Cortical Dynein Is Critical for Proper Spindle Positioning in Human Cells ». *J Cell Biol* 199 (1): 97-110. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203166>.
- Kotak, Sachin, et Pierre Gönczy. 2013. « Mechanisms of Spindle Positioning: Cortical Force Generators in the Limelight ». *Current Opinion in Cell Biology* 25 (6): 741-48. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.07.008>.
- Kotak, Sachin, et Pierre Gönczy. « NuMA phosphorylation dictates dynein-dependent spindle positioning ». *Cell Cycle* 13 (2): 177-78. <https://doi.org/10.4161/cc.27040>.
- Kruchten, Anne E., Eugene W. Krueger, Yu Wang, et Mark A. McNiven. 2008. « Distinct phospho-forms of cortactin differentially regulate actin polymerization and focal adhesions ». *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 295 (5): C1113-22. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00238.2008>.
- Kschonsak, Yvonne T., et Ingrid Hoffmann. 2018. « Activated Ezrin Controls MISP Levels to Ensure Correct NuMA Polarization and Spindle Orientation ». *J Cell Sci*, janvier, jcs.214544. <https://doi.org/10.1242/jcs.214544>.
- Kunda, Patricia, et Buzz Baum. 2009. « The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning ». *Trends in Cell Biology* 19 (4): 174-79. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.01.006>.
- Kunda, Patricia, Andrew E. Pelling, Tao Liu, et Buzz Baum. 2008. « Moesin Controls Cortical Rigidity, Cell Rounding, and Spindle Morphogenesis during Mitosis ». *Current Biology* 18 (2): 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.051>.
- Kuo, Jean-Cheng. 2014. « Chapter Three - Focal Adhesions Function as a Mechanosensor ». In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, édité par Adam J. Engler et Sanjay Kumar, 126:55-73. Mechanotransduction. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394624-9.00003-8>.
- Kuo, Jean-Cheng, Xuemei Han, Cheng-Te Hsiao, John R. Yates, et Clare M. Waterman. 2011. « Analysis of the myosinII-responsive focal adhesion proteome reveals a role for β -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation ». *Nature cell biology* 13 (4): 383-93. <https://doi.org/10.1038/ncb2216>.
- Kurochkina, Natalya, et Udayan Guha. 2012. « SH3 domains: modules of protein-protein interactions ». *Biophysical Reviews* 5 (1): 29-39. <https://doi.org/10.1007/s12551-012-0081-z>.
- Kurosawa, Masaru, Gen Matsumoto, Hiroyuki Sumikura, Hiroyuki Hatsuta, Shigeo Murayama, Takashi Sakurai, Tomomi Shimogori, Nobutaka Hattori, et Nobuyuki Nukina. 2016. « Serine 403-phosphorylated p62/SQSTM1 immunoreactivity in inclusions of neurodegenerative diseases ». *Neuroscience Research* 103 (février): 64-70. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.08.002>.
- Kuusisto, Erkki, Antero Salminen, et Irina Alafuzoff. 2001. « Ubiquitin-Binding Protein P62 Is Present in Neuronal and Glial Inclusions in Human Tauopathies and Synucleinopathies ». *Neuroreport* 12 (10): 2085-90. <https://doi.org/10.1097/00001756-200107200-00009>.
- Kwok, Alice S., Kanchan Phadwal, Bradley J. Turner, Peter L. Oliver, Annie Raw, Anna Katharina Simon, Kevin Talbot, et Vishwas R. Agashe. 2011. « HspB8 Mutation Causing Hereditary Distal Motor Neuropathy Impairs Lysosomal Delivery of Autophagosomes ». *Journal of Neurochemistry* 119 (6): 1155-61. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07521.x>.
- Kwon, Mijung, Maria Bagonis, Gaudenz Danuser, et David Pellman. 2015. « Direct Microtubule-Binding by Myosin-10 Orients Centrosomes toward Retraction Fibers and Subcortical Actin Clouds ». *Developmental Cell* 34 (3): 323-37. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.013>.
- Labbadia, Johnathan, et Richard I. Morimoto. 2015. « The Biology of Proteostasis in Aging and Disease ». *Annual Review of Biochemistry* 84 (1): 435-64. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-033955>.

- Lafarga, Vanesa, Ivette Aymerich, Olga Tapia, Federico Mayor, et Petronila Penela. 2012. « A Novel GRK2/HDAC6 Interaction Modulates Cell Spreading and Motility ». *The EMBO Journal* 31 (4): 856-69. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.466>.
- Lahvic, Jamie L., Yongchang Ji, Paloma Marin, Jonah P. Zuflacht, Mark W. Springel, Jonathan E. Wosen, Leigh Davis, Lara D. Hutson, Jeffrey D. Amack, et Martha J. Marvin. 2013. « Small Heat Shock Proteins Are Necessary for Heart Migration and Laterality Determination in Zebrafish ». *Developmental Biology* 384 (2): 166-80. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.10.009>.
- Lamark, Trond, Maria Perander, Heidi Outzen, Kurt Kristiansen, Aud Øvervatn, Espen Michaelsen, Geir Bjørkøy, et Terje Johansen. 2003. « Interaction Codes within the Family of Mammalian Phox and Bem1p Domain-Containing Proteins ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (36): 34568-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303221200>.
- Lamark, Trond, Steingrim Svenning, et Terje Johansen. 2017. « Regulation of Selective Autophagy: The P62/SQSTM1 Paradigm ». *Essays In Biochemistry* 61 (6): 609-24. <https://doi.org/10.1042/EBC20170035>.
- Lancaster, Oscar M., et Buzz Baum. 2014. « Shaping up to divide: Coordinating actin and microtubule cytoskeletal remodelling during mitosis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, mRNA stability and degradation & Timing of mammalian embryogenesis & Positioning of the Mitotic Spindle, 34 (octobre): 109-15. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.02.015>.
- Lancaster, Oscar M., Maël Le Berre, Andrea Dimitracopoulos, Daria Bonazzi, Ewa Zlotek-Zlotkiewicz, Remigio Picone, Thomas Duke, Matthieu Piel, et Buzz Baum. 2013. « Mitotic Rounding Alters Cell Geometry to Ensure Efficient Bipolar Spindle Formation ». *Developmental Cell* 25 (3): 270-83. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.03.014>.
- Lancaster, Oscar M., Maël Le Berre, Andrea Dimitracopoulos, Daria Bonazzi, Ewa Zlotek-Zlotkiewicz, Remigio Picone, Thomas Duke, Matthieu Piel, et Buzz Baum. 2013. « Mitotic Rounding Alters Cell Geometry to Ensure Efficient Bipolar Spindle Formation ». *Developmental Cell* 25 (3): 270-83. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.03.014>.
- Lanneau, D., M. Brunet, E. Frisan, E. Solary, M. Fontenay, et C. Garrido. 2008. « Heat Shock Proteins: Essential Proteins for Apoptosis Regulation ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12 (3): 743-61. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x>.
- Larochelle, Stéphane, Karl A. Merrick, Marie-Emilie Terret, Lara Wohlbold, Nora M. Barboza, Chao Zhang, Kevan M. Shokat, Prasad V. Jallepalli, et Robert P. Fisher. 2007. « Requirements for Cdk7 in the Assembly of Cdk1/Cyclin B and Activation of Cdk2 Revealed by Chemical Genetics in Human Cells ». *Molecular Cell* 25 (6): 839-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.003>.
- Lau, Alexandria, Xiao-Jun Wang, Fei Zhao, Nicole F. Villeneuve, Tongde Wu, Tao Jiang, Zheng Sun, Eileen White, et Donna D. Zhang. 2010. « A Noncanonical Mechanism of Nrf2 Activation by Autophagy Deficiency: Direct Interaction between Keap1 and P62 ». *Molecular and Cellular Biology* 30 (13): 3275-85. <https://doi.org/10.1128/MCB.00248-10>.
- Lavoie, J. N., G. Gingras-Breton, R. M. Tanguay, et J. Landry. 1993. « Induction of Chinese Hamster HSP27 Gene Expression in Mouse Cells Confers Resistance to Heat Shock. HSP27 Stabilization of the Microfilament Organization. ». *Journal of Biological Chemistry* 268 (5): 3420-29.
- Lavoie, J. N., E. Hickey, L. A. Weber, et J. Landry. 1993. « Modulation of Actin Microfilament Dynamics and Fluid Phase Pinocytosis by Phosphorylation of Heat Shock Protein 27. ». *Journal of Biological Chemistry* 268 (32): 24210-14.
- Lavoie, J. N., H. Lambert, E. Hickey, L. A. Weber, et J. Landry. 1995. « Modulation of Cellular Thermoresistance and Actin Filament Stability Accompanies Phosphorylation-Induced Changes in the Oligomeric Structure of Heat Shock Protein 27. ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (1): 505-16. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.1.505>.
- Lawson, Campbell D, et Keith Burridge. 2014. « The on-off relationship of Rho and Rac during integrin-mediated adhesion and cell migration ». *Small GTPases* 5 (mars). <https://doi.org/10.4161/sgtp.27958>.
- Lee, Chi F., Girish C. Melkani, et Sanford I. Bernstein. 2014. « Chapter Four - The UNC-45 Myosin Chaperone: From Worms to Flies to Vertebrates ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Kwang W. Jeon, 313:103-44. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800177-6.00004-9>.

- Lee, J. H., T. Takahashi, N. Yasuhara, J. Inazawa, S. Kamada, et Y. Tsujimoto. 1999. « Bis, a Bcl-2-Binding Protein That Synergizes with Bcl-2 in Preventing Cell Death ». *Oncogene* 18 (46): 6183-90. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203043>.
- Lee, Joong-Won, Hee-Jin Kwak, Je-Jung Lee, Yong-Nyun Kim, Jung Weon Lee, Myung-Jin Park, Seung Eun Jung, Seok-Il Hong, Jeong-Hwa Lee, et Jae-Seon Lee. 2008. « HSP27 Regulates Cell Adhesion and Invasion via Modulation of Focal Adhesion Kinase and MMP-2 Expression ». *European Journal of Cell Biology* 87 (6): 377-87. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.03.006>.
- Lee, Joo-Yong, Hiroshi Koga, Yoshiharu Kawaguchi, Waixing Tang, Esther Wong, Ya-Sheng Gao, Udai B. Pandey, et al. 2010. « HDAC6 Controls Autophagosome Maturation Essential for Ubiquitin-selective Quality-control Autophagy ». *The EMBO Journal* 29 (5): 969-80. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.405>.
- Lehtimäki, Jaakko I., Aidan M. Fenix, Tommi M. Kotila, Giuseppe Balistreri, Lassi Paavolainen, Markku Varjosalo, Dylan T. Burnette, et Pekka Lappalainen. 2017. « UNC-45a Promotes Myosin Folding and Stress Fiber Assembly ». *J Cell Biol* 216 (12): 4053-72. <https://doi.org/10.1083/jcb.201703107>.
- Lentze, Nicolas, et Franz Narberhaus. 2004. « Detection of oligomerisation and substrate recognition sites of small heat shock proteins by peptide arrays ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 325 (2): 401-7. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.043>.
- Lentze, Nicolas, Sonja Studer, et Franz Narberhaus. 2003. « Structural and Functional Defects Caused by Point Mutations in the α -Crystallin Domain of a Bacterial α -Heat Shock Protein ». *Journal of Molecular Biology* 328 (4): 927-37. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00356-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00356-5).
- Leroux, M. R., R. Melki, B. Gordon, G. Batelier, et E. P. Candido. 1997. « Structure-Function Studies on Small Heat Shock Protein Oligomeric Assembly and Interaction with Unfolded Polypeptides ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (39): 24646-56.
- Letort, Gaëlle, Hajer Ennomani, Laurène Gressin, Manuel Théry, et Laurent Blanchoin. 2015. « Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton ». *F1000Research* 4 (octobre). <https://doi.org/10.12688/f1000research.6374.1>.
- Levine, Beth, et Guido Kroemer. 2008. « Autophagy in the Pathogenesis of Disease ». *Cell* 132 (1): 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>.
- Li, Jianke, April N. Meyer, et Daniel J. Donoghue. 1997. « Nuclear Localization of Cyclin B1 Mediates Its Biological Activity and Is Regulated by Phosphorylation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (2): 502-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.502>.
- Li, N., Z.-X. Du, Z.-H. Zong, B.-Q. Liu, C. Li, Q. Zhang, et H.-Q. Wang. 2013. « PKC δ -Mediated Phosphorylation of BAG3 at Ser187 Site Induces Epithelial-mesenchymal Transition and Enhances Invasiveness in Thyroid Cancer FRO Cells ». *Oncogene* 32 (38): 4539-48. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.466>.
- Li, Pilong, Sudeep Banjade, Hui-Chun Cheng, Soyeon Kim, Baoyu Chen, Liang Guo, Marc Llaguno, et al. 2012. « Phase Transitions in the Assembly of Multivalent Signalling Proteins ». *Nature* 483 (7389): 336-40. <https://doi.org/10.1038/nature10879>.
- Li, Xiao-shan, Qing Xu, Xiang-yang Fu, et Wei-sheng Luo. 2014. « Heat Shock Protein 22 Overexpression Is Associated with the Progression and Prognosis in Gastric Cancer ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 140 (8): 1305-13. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1698-z>.
- Li, Zhiyuan, Xinmiao Ji, Dongmei Wang, Juanjuan Liu, et Xin Zhang. 2016. « Autophagic flux is highly active in early mitosis and differentially regulated throughout the cell cycle ». *Oncotarget* 7 (26): 39705-18. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9451>.
- Li, Zhiyuan, et Xin Zhang. 2016. « Autophagy in Mitotic Animal Cells ». *Science Bulletin* 61 (2): 105-7. <https://doi.org/10.1007/s11434-015-0964-z>.
- Lim, Junghyun, Hyun-Wook Kim, Moussa B. H. Youdim, Im Joo Rhyu, Kwang-Min Choe, et Young J. Oh. 2011. « Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux ». *Autophagy* 7 (1): 51-60. <https://doi.org/10.4161/auto.7.1.13909>.
- Lim, Junghyun, M. Lenard Lachenmayer, Shuai Wu, Wenchao Liu, Mondira Kundu, Rong Wang, Masaaki Komatsu, Young J. Oh, Yanxiang Zhao, et Zhenyu Yue. 2015. « Proteotoxic Stress Induces Phosphorylation of P62/SQSTM1 by ULK1 to Regulate Selective Autophagic Clearance of Protein Aggregates ». *PLOS Genetics* 11 (2): e1004987. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004987>.
- Lin, Xiaolong, Shuang Li, Yue Zhao, Xiaofeng Ma, Kai Zhang, Xinglan He, et Zuo Wang. 2013. « Interaction Domains of p62: A Bridge Between p62 and Selective Autophagy ». *DNA and Cell Biology* 32 (5): 220-27. <https://doi.org/10.1089/dna.2012.1915>.

- Linares, Juan F., Ramars Amanchy, Maria T. Diaz-Meco, et Jorge Moscat. 2011. « Phosphorylation of P62 by Cdk1 Controls the Timely Transit of Cells through Mitosis and Tumor Cell Proliferation ». *Molecular and Cellular Biology* 31 (1): 105-17. <https://doi.org/10.1128/MCB.00620-10>.
- Linares, Juan F., Angeles Duran, Miguel Reina-Campos, Pedro Aza-Blanc, Alex Campos, Jorge Moscat, et Maria T. Diaz-Meco. 2015. « Amino Acid Activation of mTORC1 by a PB1-Domain-Driven Kinase Complex Cascade ». *Cell Reports* 12 (8): 1339-52. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.07.045>.
- Linnemann, Anja, Padmanabhan Vakeel, Eduardo Bezerra, Zacharias Orfanos, Kristina Djinović-Carugo, Peter F. M. van der Ven, Gregor Kirfel, et Dieter O. Fürst. 2013. « Myopodin Is an F-Actin Bundling Protein with Multiple Independent Actin-Binding Regions ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 34 (1): 61-69. <https://doi.org/10.1007/s10974-012-9334-5>.
- Liu, Jianmin, Mitali Das, Jun Yang, Sujay Subbaya Ithychanda, Valentin P. Yakubenko, Edward F. Plow, et Jun Qin. 2015. « Structural Mechanism of Integrin Inactivation by Filamin ». *Nature Structural & Molecular Biology* 22 (5): 383-89. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2999>.
- Liu, Wei Jing, Lin Ye, Wei Fang Huang, Lin Jie Guo, Zi Gan Xu, Hong Luan Wu, Chen Yang, et Hua Feng Liu. 2016. « p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation ». *Cellular & Molecular Biology Letters* 21 (décembre). <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0031-z>.
- Lock, John G., Matthew C. Jones, Janet A. Askari, Xiaowei Gong, Anna Oddone, Helene Olofsson, Sara Göransson, Melike Lakadamyali, Martin J. Humphries, et Staffan Strömblad. 2018. « Reticular Adhesions Are a Distinct Class of Cell-Matrix Adhesions That Mediate Attachment during Mitosis ». *Nature Cell Biology* 20 (11): 1290. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0220-2>.
- Long, Jed, Thomas R. A. Gallagher, James R. Cavey, Paul W. Sheppard, Stuart H. Ralston, Robert Layfield, et Mark S. Searle. 2008. « Ubiquitin Recognition by the Ubiquitin-Associated Domain of P62 Involves a Novel Conformational Switch ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5427-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704973200>.
- Loukil, Abdelhalim, Manuela Zonca, Cosette Rebouissou, Véronique Baldin, Olivier Coux, Martine Biard-Piechaczyk, Jean-Marie Blanchard, et Marion Peter. 2014. « High-Resolution Live-Cell Imaging Reveals Novel Cyclin A2 Degradation Foci Involving Autophagy ». *J Cell Sci* 127 (10): 2145-50. <https://doi.org/10.1242/jcs.139188>.
- Lu, Huan, Qun Zhao, Hao Jiang, Tongge Zhu, Peng Xia, William Seffens, Felix Aikhionbare, Dongmei Wang, Zhen Dou, et Xuebiao Yao. 2014. « Characterization of Ring-Like F-Actin Structure as a Mechanical Partner for Spindle Positioning in Mitosis ». *PLOS ONE* 9 (10): e102547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102547>.
- Lüders, J., J. Demand, et J. Höhfeld. 2000. « The Ubiquitin-Related BAG-1 Provides a Link between the Molecular Chaperones Hsc70/Hsp70 and the Proteasome ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (7): 4613-17.
- Lüscher, B., L. Brizuela, D. Beach, et R. N. Eisenman. 1991. « A Role for the P34cdc2 Kinase and Phosphatases in the Regulation of Phosphorylation and Disassembly of Lamin B2 during the Cell Cycle. » *The EMBO Journal* 10 (4): 865-75. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb08019.x>.
- Ma, Sheng, Suzanne Vigneron, Perle Robert, Jean Marc Strub, Sara Cianferani, Anna Castro, et Thierry Lorca. 2016. « Greatwall Dephosphorylation and Inactivation upon Mitotic Exit Is Triggered by PPI ». *J Cell Sci* 129 (7): 1329-39. <https://doi.org/10.1242/jcs.178855>.
- Ma, Yan, Xi Yuan, William R. Wyatt, et Joseph R. Pomeroy. 2012. « Expression of Constitutively Active CDK1 Stabilizes APC-Cdh1 Substrates and Potentiates Premature Spindle Assembly and Checkpoint Function in G1 Cells ». *PLOS ONE* 7 (3): e33835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033835>.
- Machicoane, Mickael, Cristina A. de Frutos, Jenny Fink, Murielle Rocancourt, Yannis Lombardi, Sonia Garel, Matthieu Piel, et Arnaud Echard. 2014. « SLK-Dependent Activation of ERMs Controls LGN-NuMA Localization and Spindle Orientation ». *J Cell Biol* 205 (6): 791-99. <https://doi.org/10.1083/jcb.201401049>.
- Maddox, Amy Shaub, et Keith Burridge. 2003. « RhoA Is Required for Cortical Retraction and Rigidity during Mitotic Cell Rounding ». *The Journal of Cell Biology* 160 (2): 255-65. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207130>.
- Maier, Bettina, Michael Kirsch, Simon Anderhub, Hanswalter Zentgraf, et Alwin Krämer. 2013. « The novel actin/focal adhesion-associated protein MISP is involved in mitotic spindle positioning in human cells ». *Cell Cycle* 12 (9): 1457-71. <https://doi.org/10.4161/cc.24602>.

- Mali, Prashant, Denis Wirtz, et Peter C. Searson. 2010. « Interplay of RhoA and Motility in the Programmed Spreading of Daughter Cells Postmitosis ». *Biophysical Journal* 99 (11): 3526-34. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.006>.
- Mall, Moritz, Thomas Walter, Mátyás Gorjánác, Iain F. Davidson, Thi Bach Nga Ly-Hartig, Jan Ellenberg, et Iain W. Mattaj. 2012. « Mitotic Lamin Disassembly Is Triggered by Lipid-Mediated Signaling ». *J Cell Biol* 198 (6): 981-90. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205103>.
- Malumbres, Marcos, et Mariano Barbacid. 2005. « Mammalian Cyclin-Dependent Kinases ». *Trends in Biochemical Sciences* 30 (11): 630-41. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.005>.
- Manning, Jantina, et Sharad Kumar. 2007. « NEDD1: Function in microtubule nucleation, spindle assembly and beyond ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 (1): 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.08.012>.
- Mannini, Benedetta, Roberta Cascella, Mariagioia Zampagni, Maria van Waarde-Verhagen, Sarah Meehan, Cintia Roodveldt, Silvia Campioni, et al. 2012. « Molecular mechanisms used by chaperones to reduce the toxicity of aberrant protein oligomers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (31): 12479-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117799109>.
- Marchesi, Stefano, Francesca Montani, Gianluca Deflorian, Rocco D'Antuono, Alessandro Cuomo, Serena Bologna, Carmela Mazzoccoli, Tiziana Bonaldi, Pier Paolo Di Fiore, et Francesco Nicassio. 2014. « DEPDC1B Coordinates De-Adhesion Events and Cell-Cycle Progression at Mitosis ». *Developmental Cell* 31 (4): 420. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.09.009>.
- Marco, Margot De, Maria Caterina Turco, et Alessandra Rosati. 2011. « BAG3 protein is induced during cardiomyoblast differentiation and modulates myogenin expression ». *Cell Cycle* 10 (5): 850-52. <https://doi.org/10.4161/cc.10.5.14964>.
- Masiero, Eva, et Marco Sandri. 2010. « Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles ». *Autophagy* 6 (2): 307-9. <https://doi.org/10.4161/auto.6.2.11137>.
- Mathew, Robin, Cristina M. Karp, Brian Beaudoin, Nhan Vuong, Guanghua Chen, Hsin-Yi Chen, Kevin Bray, et al. 2009. « Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of P62 ». *Cell* 137 (6): 1062-75. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.048>.
- Matsumoto, Gen, Koji Wada, Misako Okuno, Masaru Kurosawa, et Nobuyuki Nukina. 2011. « Serine 403 Phosphorylation of p62/SQSTM1 Regulates Selective Autophagic Clearance of Ubiquitinated Proteins ». *Molecular Cell* 44 (2): 279-89. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.039>.
- Matsumura, Fumio. 2005. « Regulation of Myosin II during Cytokinesis in Higher Eukaryotes ». *Trends in Cell Biology* 15 (7): 371-77. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.05.004>.
- Matsushima-Nishiwaki, Rie, Hidenori Toyoda, Reika Takamatsu, Eisuke Yasuda, Seiji Okuda, Atsuyuki Maeda, Yuji Kaneoka, Naoki Yoshimi, Takashi Kumada, et Osamu Kozawa. 2017. « Heat shock protein 22 (HSPB8) reduces the migration of hepatocellular carcinoma cells through the suppression of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT pathway ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1863 (6): 1629-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.04.021>.
- Matthews, Helen K., Ulysse Delabre, Jennifer L. Rohn, Jochen Guck, Patricia Kunda, et Buzz Baum. 2012. « Changes in Ect2 Localization Couple Actomyosin-Dependent Cell Shape Changes to Mitotic Progression ». *Developmental Cell* 23 (2): 371-83. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.06.003>.
- Mchaourab, Hassane S., Jared A. Godar, et Phoebe L. Stewart. 2009. « Structure and Mechanism of Protein Stability Sensors: Chaperone Activity of Small Heat Shock Proteins ». *Biochemistry* 48 (18): 3828-37. <https://doi.org/10.1021/bi900212j>.
- Melkani, Girish C., Anthony Cammarato, et Sanford I. Bernstein. 2006. « α B-Crystallin Maintains Skeletal Muscle Myosin Enzymatic Activity and Prevents its Aggregation under Heat-shock Stress ». *Journal of Molecular Biology* 358 (3): 635-45. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.043>.
- Meng, X., D.-H. Kong, N. Li, Z.-H. Zong, B.-Q. Liu, Z.-X. Du, Y. Guan, L. Cao, et H.-Q. Wang. 2014. « Knockdown of BAG3 Induces Epithelial–Mesenchymal Transition in Thyroid Cancer Cells through ZEB1 Activation ». *Cell Death & Disease* 5 (2): e1092. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.32>.
- Meredith, Stephen C. 2005. « Protein Denaturation and Aggregation ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1066 (1): 181-221. <https://doi.org/10.1196/annals.1363.030>.
- Michel, Marcus, et Christian Dahmann. 2016. « Memorizing Shape to Orient Cell Division ». *Developmental Cell* 36 (6): 589-90. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.03.005>.
- Minoia, Melania, Alessandra Boncoraglio, Jonathan Vinet, Federica F. Morelli, Jeanette F. Brunsting, Angelo Poletti, Sabine Krom, Eric Reits, Harm H. Kampinga, et Serena Carra. 2014. « BAG3 Induces the

- Sequestration of Proteasomal Clients into Cytoplasmic Puncta: Implications for a Proteasome-to-Autophagy Switch ». *Autophagy* 10 (9): 1603-21. <https://doi.org/10.4161/autophagy.29409>.
- Miron, T., M. Wilchek, et B. Geiger. 1988. « Characterization of an Inhibitor of Actin Polymerization in Vinculin-Rich Fraction of Turkey Gizzard Smooth Muscle ». *European Journal of Biochemistry* 178 (2): 543-53.
- Mitchison, T. J. 1992. « Actin Based Motility on Retraction Fibers in Mitotic PtK2 Cells ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 22 (2): 135-51. <https://doi.org/10.1002/cm.970220207>.
- Mitchison, T. J., et L. P. Cramer. 1996. « Actin-Based Cell Motility and Cell Locomotion ». *Cell* 84 (3): 371-79. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81281-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81281-7).
- Mitsushima, Masaru, Kazuhiro Aoki, Miki Ebisuya, Shigeru Matsumura, Takuya Yamamoto, Michiyuki Matsuda, Fumiko Toyoshima, et Eisuke Nishida. 2010. « Revolving Movement of a Dynamic Cluster of Actin Filaments during Mitosis ». *The Journal of Cell Biology* 191 (3): 453-62. <https://doi.org/10.1083/jcb.201007136>.
- Mizushima, Noboru, et Masaaki Komatsu. 2011. « Autophagy: Renovation of Cells and Tissues ». *Cell* 147 (4): 728-41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>.
- Mochida, Satoru, Sarah L. Maslen, Mark Skehel, et Tim Hunt. 2010. « Greatwall Phosphorylates an Inhibitor of Protein Phosphatase 2A That Is Essential for Mitosis ». *Science* 330 (6011): 1670-73. <https://doi.org/10.1126/science.1195689>.
- Montagna, Georgina N., Kai Matuschewski, et Carlos A. Buscaglia. 2012. « Small Heat Shock Proteins in Cellular Adhesion and Migration: Evidence from Plasmodium Genetics ». *Cell Adhesion & Migration* 6 (2): 78-84. <https://doi.org/10.4161/cam.20101>.
- Montfort, R. L. van, E. Basha, K. L. Friedrich, C. Slingsby, et E. Vierling. 2001. « Crystal Structure and Assembly of a Eukaryotic Small Heat Shock Protein ». *Nature Structural Biology* 8 (12): 1025-30. <https://doi.org/10.1038/nsb722>.
- Morelli, Federica F., Laura Mediani, Lonneke Heldens, Jessika Bertacchini, Ilaria Bigi, Arianna Dorotea Carrà, Jonathan Vinet, et Serena Carra. 2017. « An interaction study in mammalian cells demonstrates weak binding of HSPB2 to BAG3, which is regulated by HSPB3 and abrogated by HSPB8 ». *Cell Stress & Chaperones* 22 (4): 531-40. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0769-x>.
- Moreno, Sergio, Jacqueline Hayles, et Paul Nurse. 1989. « Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis ». *Cell* 58 (2): 361-72. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90850-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90850-7).
- Morgan, David O. 1995. « Principles of CDK Regulation ». *Nature* 374 (6518): 131-34. <https://doi.org/10.1038/374131a0>.
- Morgan, David O. 1999. « Regulation of the APC and the Exit from Mitosis ». *Nature Cell Biology* 1 (2): E47-53. <https://doi.org/10.1038/10039>.
- Morgan, David O. 2008. « SnapShot: Cell-Cycle Regulators I ». *Cell* 135 (4): 764-764.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.039>.
- Morris, Edward James, Kiran Assi, Baljinder Salh, et Shoukat Dedhar. 2015. « Integrin-Linked Kinase Links Dynactin-1/Dynactin-2 with Cortical Integrin Receptors to Orient the Mitotic Spindle Relative to the Substratum ». *Scientific Reports* 5 (février): 8389. <https://doi.org/10.1038/srep08389>.
- Morrow, Geneviève, et Robert M. Tanguay. 2012. « Small heat shock protein expression and functions during development ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Directed Issue: Small HSPs in Physiology and Pathology, 44 (10): 1613-21. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.009>.
- Mounier, Nicole, et André-Patrick Arrigo. 2002. « Actin Cytoskeleton and Small Heat Shock Proteins: How Do They Interact? ». *Cell Stress & Chaperones* 7 (2): 167-76.
- Mullins, R. Dyche, John A. Heuser, et Thomas D. Pollard. 1998. « The Interaction of Arp2/3 Complex with Actin: Nucleation, High Affinity Pointed End Capping, and Formation of Branching Networks of Filaments ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (11): 6181-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6181>.
- Murali, Arun, et Krishnaraj Rajalingam. 2014. « Small Rho GTPases in the Control of Cell Shape and Mobility ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 71 (9): 1703-21. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1519-6>.
- Murray, Andrew W., Mark J. Solomon, et Marc W. Kirschner. 1989. « The Role of Cyclin Synthesis and Degradation in the Control of Maturation Promoting Factor Activity ». *Nature* 339 (6222): 280-86. <https://doi.org/10.1038/339280a0>.
- Myers Valerie D., Tomar Dhanendra, Madesh Muniswamy, Wang JuFang, Song Jianliang, Zhang Xue-Qian, Gupta Manish K., et al. 2018. « Haplo-insufficiency of Bcl2-associated athanogene 3 in mice results

- in progressive left ventricular dysfunction, β -adrenergic insensitivity, and increased apoptosis ». *Journal of Cellular Physiology* 0 (0). <https://doi.org/10.1002/jcp.26482>.
- Mymrikov, Evgeny V., Marina Daake, Bettina Richter, Martin Haslbeck, et Johannes Buchner. 2017. « The Chaperone Activity and Substrate Spectrum of Human Small Heat Shock Proteins ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (2): 672-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.760413>.
- Nain, Amrinder S., et Daniela Cimini. 2013. « MISP: The missing link between extracellular matrix and astral microtubules ». *Cell Cycle* 12 (12): 1821-1821. <https://doi.org/10.4161/cc.25171>.
- Nakamura, Kazuhiro, Adam J. Kimple, David P. Siderovski, et Gary L. Johnson. 2010. « PB1 Domain Interaction of P62/Sequestosome 1 and MEKK3 Regulates NF-KB Activation ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (3): 2077-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.065102>.
- Nasa, Isha, et Arminja N. Kettenbach. 2018. « Coordination of Protein Kinase and Phosphoprotein Phosphatase Activities in Mitosis ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (mars). <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00030>.
- Naylor, Ryan M., et Jan M. van Deursen. 2016. « Aneuploidy in Cancer and Aging ». *Annual Review of Genetics* 50 (1): 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035303>.
- Nestor-Bergmann, Alexander, Georgina Goddard, et Sarah Woolner. 2014. « Force and the spindle: Mechanical cues in mitotic spindle orientation ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, mRNA stability and degradation & Timing of mammalian embryogenesis & Positioning of the Mitotic Spindle, 34 (octobre): 133-39. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.07.008>.
- Nikonova, Anna S., Igor Astsaturov, Ilya G. Serebriiskii, Roland L. Dunbrack, et Erica A. Golemis. 2013. « Aurora A Kinase (AURKA) in Normal and Pathological Cell Division ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 70 (4): 661-87. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1073-7>.
- Nolen, B. J., N. Tomasevic, A. Russell, D. W. Pierce, Z. Jia, C. D. McCormick, J. Hartman, R. Sakowicz, et T. D. Pollard. 2009. « Characterization of Two Classes of Small Molecule Inhibitors of Arp2/3 Complex ». *Nature* 460 (7258): 1031-34. <https://doi.org/10.1038/nature08231>.
- Obaya, A.J., et J.M. Sedivy. 2002. « Regulation of Cyclin-Cdk Activity in Mammalian Cells ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 59 (1): 126-42. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8410-1>.
- Odgerel, Zagaa, Anna Sarkozy, Hee-Suk Lee, Caoimhe McKenna, Julia Rankin, Volker Straub, Hanns Lochmüller, et al. 2010. « Inheritance Patterns and Phenotypic Features of Myofibrillar Myopathy Associated with a BAG3 Mutation ». *Neuromuscular Disorders* 20 (7): 438-42. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.05.004>.
- Olsen, Jesper V., Michiel Vermeulen, Anna Santamaria, Chanchal Kumar, Martin L. Miller, Lars J. Jensen, Florian Gnad, et al. 2010. « Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy During Mitosis ». *Sci. Signal.* 3 (104): ra3-ra3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000475>.
- Olzmann, James A., et Lih-Shen Chin. 2008. « Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination ». *Autophagy* 4 (1): 85-87.
- Olzscha, Heidi, Sonya M. Schermann, Andreas C. Woerner, Stefan Pinkert, Michael H. Hecht, Gian G. Tartaglia, Michele Vendruscolo, Manajit Hayer-Hartl, F. Ulrich Hartl, et R. Martin Vabulas. 2011. « Amyloid-like Aggregates Sequester Numerous Metastable Proteins with Essential Cellular Functions ». *Cell* 144 (1): 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.050>.
- Ono, Shoichiro. 2010. « Dynamic Regulation of Sarcomeric Actin Filaments in Striated Muscle ». *Cytoskeleton* 67 (11): 677-92. <https://doi.org/10.1002/cm.20476>.
- Palumbo, Silvia, Paolo Tini, Marzia Toscano, Giulia Allavena, Francesca Angeletti, Federico Manai, Clelia Miracco, Sergio Comincini, et Luigi Pirtoli. 2014. « Combined EGFR and Autophagy Modulation Impairs Cell Migration and Enhances Radiosensitivity in Human Glioblastoma Cells ». *Journal of Cellular Physiology* 229 (11): 1863-73. <https://doi.org/10.1002/jcp.24640>.
- Pan, Ji-An, Yu Sun, Ya-Ping Jiang, Alex J. Bott, Nadia Jaber, Zhixun Dou, Bin Yang, et al. 2016. « TRIM21 Ubiquitylates SQSTM1/P62 and Suppresses Protein Sequestration to Regulate Redox Homeostasis ». *Molecular Cell* 61 (5): 720-33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.007>.
- Pang, Min. 2016. « Autophagy Links β -Catenin and Smad Signaling to Promote Epithelial-Mesenchymal Transition via Upregulation of Integrin Linked Kinase ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 76 (juillet): 123-34. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.010>.
- Pankiv, Serhiy, Terje Høyvarde Clausen, Trond Lamark, Andreas Brech, Jack-Ansgar Bruun, Heidi Outzen, Aud Øvervatn, Geir Bjørkøy, et Terje Johansen. 2007. « P62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3

- to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (33): 24131-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702824200>.
- Pankiv, Serhiy, Trond Lamark, Jack-Ansgar Bruun, Aud Øvervatn, Geir Bjørkøy, et Terje Johansen. 2010. « Nucleocytoplasmic Shuttling of P62/SQSTM1 and Its Role in Recruitment of Nuclear Polyubiquitinated Proteins to Promyelocytic Leukemia Bodies ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (8): 5941-53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.039925>.
- Papa, Iris, Catherine Astier, Olivier Kwiatek, Fabrice Raynaud, Chantal Bonnal, Marie-Christine Lebart, Claude Roustan, et Yves Benyamin. 1999. « Alpha Actinin–CapZ, an Anchoring Complex for Thin Filaments in Z-Line ». *Journal of Muscle Research & Cell Motility* 20 (2): 187-97. <https://doi.org/10.1023/A:1005489319058>.
- Park, Ah-Mee, Kyosuke Kanai, Tatsuki Itoh, Takao Sato, Tatsuya Tsukui, Yutaka Inagaki, Moises Selman, Kouji Matsushima, et Osamu Yoshie. 2016. « Heat Shock Protein 27 Plays a Pivotal Role in Myofibroblast Differentiation and in the Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis ». *PLoS One* 11 (2): e0148998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148998>.
- Parrilla, Alfonso, Luca Cirillo, Yann Thomas, Monica Gotta, Lionel Pintard, et Anna Santamaria. 2016. « Mitotic entry: The interplay between Cdk1, Plk1 and Bora ». *Cell Cycle* 15 (23): 3177-82. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1249544>.
- Pasapera, Ana M., Sergey V. Plotnikov, Robert S. Fischer, Lindsay B. Case, Thomas T. Egelhoff, et Clare M. Waterman. 2015. « Rac1-Dependent Phosphorylation and Focal Adhesion Recruitment of Myosin IIA Regulates Migration and Mechanosensing ». *Current Biology* 25 (2): 175-86. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.043>.
- Patel, Hitesh, Ifigeneia Stavrou, Roshan L. Shrestha, Viji Draviam, Margaret C. Frame, et Valerie G. Brunton. 2016. « Kindlin1 Regulates Microtubule Function to Ensure Normal Mitosis ». *Journal of Molecular Cell Biology* 8 (4): 338-48. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw009>.
- Paulsen, G., F. Lauritzen, M. L. Bayer, J. M. Kalhovde, I. Ugelstad, S. G. Owe, J. Hallén, L. H. Bergersen, et T. Raastad. 2009. « Subcellular movement and expression of HSP27, α B-crystallin, and HSP70 after two bouts of eccentric exercise in humans ». *Journal of Applied Physiology* 107 (2): 570-82. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00209.2009>.
- Pellegrin, Stéphanie, et Harry Mellor. 2007. « Actin Stress Fibres ». *Journal of Cell Science* 120 (20): 3491-99. <https://doi.org/10.1242/jcs.018473>.
- Peng, Hong, Jiao Yang, Guangyi Li, Qing You, Wen Han, Tianrang Li, Daming Gao, et al. 2017. « Ubiquitylation of P62/Sequestosome1 Activates Its Autophagy Receptor Function and Controls Selective Autophagy upon Ubiquitin Stress ». *Cell Research* 27 (5): 657-74. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.40>.
- Peter, Angela K., Hongqiang Cheng, Robert S. Ross, Kirk U. Knowlton, et Ju Chen. 2011. « The costamere bridges sarcomeres to the sarcolemma in striated muscle ». *Progress in pediatric cardiology* 31 (2): 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.ppedcard.2011.02.003>.
- Peter, M., E. Heitlinger, M. Häner, U. Aebi, et E. A. Nigg. 1991. « Disassembly of in Vitro Formed Lamin Head-to-Tail Polymers by CDC2 Kinase ». *The EMBO Journal* 10 (6): 1535-44. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb07673.x>.
- Peter, M., J. Nakagawa, M. Dorée, J. C. Labbé, et E. A. Nigg. 1990. « In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase ». *Cell* 61 (4): 591-602. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90471-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90471-P).
- Petridou, Nicoletta I., et Paris A. Skourides. 2014. « FAK Transduces Extracellular Forces That Orient the Mitotic Spindle and Control Tissue Morphogenesis ». *Nature Communications* 5 (octobre): 5240. <https://doi.org/10.1038/ncomms6240>.
- Petrone, Adam, Mark E. Adamo, Chao Cheng, et Arminja N. Kettenbach. 2016. « Identification of Candidate Cyclin-Dependent Kinase 1 (Cdk1) Substrates in Mitosis by Quantitative Phosphoproteomics ». *Molecular & Cellular Proteomics* 15 (7): 2448-61. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.059394>.
- Petry, Sabine. 2016. « Mechanisms of Mitotic Spindle Assembly ». *Annual Review of Biochemistry* 85 (1): 659-83. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014528>.
- Piccolella, Margherita, Valeria Crippa, Riccardo Cristofani, Paola Rusmini, Mariarita Galbiati, Maria Elena Cicardi, Marco Meroni, Nicola Ferri, Federica F. Morelli, Serena Carra, Elio Messi, Angelo Poletti, et al. 2017. « The small heat shock protein B8 (HSPB8) modulates proliferation and migration of breast cancer cells ». *Oncotarget* 8 (6): 10400-415. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14422>.

- . 2017. « The Small Heat Shock Protein B8 (HSPB8) Modulates Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells ». *Oncotarget* 8 (6): 10400-415. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14422>.
- Piccolella, Margherita, Valeria Crippa, Riccardo Cristofani, Paola Rusmini, Mariarita Galbiati, Maria Elena Cicardi, Marco Meroni, et al. 2017. « The Small Heat Shock Protein B8 (HSPB8) Modulates Proliferation and Migration of Breast Cancer Cells ». *Oncotarget*, janvier. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14422>.
- Pietro, Florencia, Arnaud Echard, et Xavier Morin. 2016. « Regulation of Mitotic Spindle Orientation: An Integrated View ». *EMBO Reports* 17 (8): 1106-30. <https://doi.org/10.15252/embr.201642292>.
- Pines, J., et T. Hunter. 1991. « Human Cyclins A and B1 Are Differentially Located in the Cell and Undergo Cell Cycle-Dependent Nuclear Transport. » *The Journal of Cell Biology* 115 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.1.1>.
- Piotrowicz, R. S., E. Hickey, et E. G. Levin. 1998. « Heat Shock Protein 27 KDa Expression and Phosphorylation Regulates Endothelial Cell Migration ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12 (14): 1481-90.
- Plesofsky-Vig, Nora, Jesse Vig, et Robert Brambl. 1992. « Phylogeny of the α -Crystallin-Related Heat-Shock Proteins ». *Journal of Molecular Evolution* 35 (6): 537-45. <https://doi.org/10.1007/BF00160214>.
- Pollard, Thomas D. 2016. « Actin and Actin-Binding Proteins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (8): a018226. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>.
- Ponuwe, Godwin A. 2016. « A Glimpse of the ERM Proteins ». *Journal of Biomedical Science* 23 (1): 35. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0246-3>.
- Prosser, Suzanna L., et Laurence Pelletier. 2017. « Mitotic Spindle Assembly in Animal Cells: A Fine Balancing Act ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (3): 187-201. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.162>.
- Quinlan, Roy A., Yan Zhang, Andrew Lansbury, Ian Williamson, Ehmke Pohl, et Fei Sun. 2013. « Changes in the Quaternary Structure and Function of MjHSP16.5 Attributable to Deletion of the IXI Motif and Introduction of the Substitution, R107G, in the α -Crystallin Domain ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 368 (1617): 20120327. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0327>.
- Rabinowitz, Joshua D., et Eileen White. 2010. « Autophagy and Metabolism ». *Science (New York, N.Y.)* 330 (6009): 1344-48. <https://doi.org/10.1126/science.1193497>.
- Rahimov, Fedik, et Louis M. Kunkel. 2013. « Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Muscular Dystrophy ». *J Cell Biol* 201 (4): 499-510. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212142>.
- Ramanathan, Subramanian P., Jonne Helenius, Martin P. Stewart, Cedric J. Cattin, Anthony A. Hyman, et Daniel J. Muller. 2015. « Cdk1-Dependent Mitotic Enrichment of Cortical Myosin II Promotes Cell Rounding against Confinement ». *Nature Cell Biology* 17 (2): 148-59. <https://doi.org/10.1038/ncb3098>.
- Ramírez-Rodríguez, Gerardo, Harish Babu, Friederike Klempin, Olga Krylyshkina, Veerle Baekelandt, Rik Gijssbers, Zeger Debyser, et al. 2013. « The α Crystallin Domain of Small Heat Shock Protein B8 (Hspb8) Acts as Survival and Differentiation Factor in Adult Hippocampal Neurogenesis ». *Journal of Neuroscience* 33 (13): 5785-96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6452-11.2013>.
- Ramkumar, Nitya, et Buzz Baum. 2016. « Coupling Changes in Cell Shape to Chromosome Segregation ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (8): 511-21. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.75>.
- Ran, Jie, Yunfan Yang, Dengwen Li, Min Liu, et Jun Zhou. 2015. « Deacetylation of α -Tubulin and Cortactin Is Required for HDAC6 to Trigger Ciliary Disassembly ». *Scientific Reports* 5 (août): 12917. <https://doi.org/10.1038/srep12917>.
- Rantanen, Krista, Juha-Pekka Pursiheimo, Heidi Högel, Petra Miikkulainen, Jari Sundström, et Panu M. Jaakkola. 2013. « P62/SQSTM1 Regulates Cellular Oxygen Sensing by Attenuating PHD3 Activity through Aggregate Sequestration and Enhanced Degradation ». *Journal of Cell Science* 126 (Pt 5): 1144-54. <https://doi.org/10.1242/jcs.115667>.
- Rauch, Jennifer N., Eric Tse, Rebecca Freilich, Sue-Ann Mok, Leah N. Makley, Daniel R. Southworth, et Jason E. Gestwicki. 2017. « BAG3 Is a Modular, Scaffolding Protein that physically Links Heat Shock Protein 70 (Hsp70) to the Small Heat Shock Proteins ». *Journal of Molecular Biology* 429 (1): 128-41. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.013>.
- Ravikumar, Brinda, Sovan Sarkar, Janet E. Davies, Marie Fütter, Moises Garcia-Arencibia, Zeyn W. Green-Thompson, Maria Jimenez-Sanchez, et al. 2010. « Regulation of Mammalian Autophagy in

- Physiology and Pathophysiology ». *Physiological Reviews* 90 (4): 1383-1435. <https://doi.org/10.1152/physrev.00030.2009>.
- Rhind, Nicholas, et Paul Russell. 2012. « Signaling Pathways That Regulate Cell Division ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (10). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005942>.
- Robellet, Xavier, Yogitha Thattikota, Fang Wang, Tse-Luen Wee, Mirela Pascariu, Sahana Shankar, Éric Bonneil, Claire M. Brown, et Damien D'Amours. 2015. « A High-Sensitivity Phospho-Switch Triggered by Cdk1 Governs Chromosome Morphogenesis during Cell Division ». *Genes & Development* 29 (4): 426-39. <https://doi.org/10.1101/gad.253294.114>.
- Rogalla, T., M. Ehrnsperger, X. Preville, A. Kotlyarov, G. Lutsch, C. Ducasse, C. Paul, et al. 1999. « Regulation of Hsp27 Oligomerization, Chaperone Function, and Protective Activity against Oxidative Stress/Tumor Necrosis Factor Alpha by Phosphorylation ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (27): 18947-56.
- Rognoni, Lorenz, Johannes Stigler, Benjamin Pelz, Jari Ylänné, et Matthias Rief. 2012. « Dynamic Force Sensing of Filamin Revealed in Single-Molecule Experiments ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (48): 19679-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211274109>.
- Rogov, Vladimir, Volker Dötsch, Terje Johansen, et Vladimir Kirkin. 2014. « Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy ». *Molecular Cell* 53 (2): 167-78. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.12.014>.
- Rondas, Dieter, Alejandra Tomas, et Philippe A. Halban. 2011. « Focal Adhesion Remodeling Is Crucial for Glucose-Stimulated Insulin Secretion and Involves Activation of Focal Adhesion Kinase and Paxillin ». *Diabetes* 60 (4): 1146-57. <https://doi.org/10.2337/db10-0946>.
- Rosa, André, Evi Vlassaks, Franck Pichaud, et Buzz Baum. 2015. « Ect2/Pbl Acts via Rho and Polarity Proteins to Direct the Assembly of an Isotropic Actomyosin Cortex upon Mitotic Entry ». *Developmental Cell* 32 (5): 604-16. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.012>.
- Rosati, A., V. Graziano, V. De Laurenzi, M. Pascale, et M. C. Turco. 2011. « BAG3: A Multifaceted Protein That Regulates Major Cell Pathways ». *Cell Death & Disease* 2 (4): e141. <https://doi.org/10.1038/cddis.2011.24>.
- Rosati, Alessandra, Anna Basile, Antonia Falco, Morena d'Avenia, Michelina Festa, Vincenzo Graziano, Vincenzo De Laurenzi, Claudio Arra, Maria Pascale, et Maria Caterina Turco. 2012. « Role of BAG3 protein in leukemia cell survival and response to therapy ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1826 (2): 365-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.001>.
- Rottner, Klemens, Jan Faix, Sven Bogdan, Stefan Linder, et Eugen Kerkhoff. 2017. « Actin Assembly Mechanisms at a Glance ». *J Cell Sci* 130 (20): 3427-35. <https://doi.org/10.1242/jcs.206433>.
- Roy, L. M., K. I. Swenson, D. H. Walker, B. G. Gabrielli, R. S. Li, H. Piwnicka-Worms, et J. L. Maller. 1991. « Activation of P34cdc2 Kinase by Cyclin A. » *The Journal of Cell Biology* 113 (3): 507-14. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.3.507>.
- Rubinsztein, David C. 2010. « Cdks Regulate Autophagy via Vps34 ». *Molecular Cell* 38 (4): 483-84. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.013>.
- Rubinsztein, David C., Carla F. Bento, et Vojo Deretic. 2015. « Therapeutic Targeting of Autophagy in Neurodegenerative and Infectious Diseases ». *Journal of Experimental Medicine* 212 (7): 979-90. <https://doi.org/10.1084/jem.20150956>.
- Ruparelia, Avnika A., Viola Oorschot, Raquel Vaz, Georg Ramm, et Robert J. Bryson-Richardson. 2014. « Zebrafish Models of BAG3 Myofibrillar Myopathy Suggest a Toxic Gain of Function Leading to BAG3 Insufficiency ». *Acta Neuropathologica* 128 (6): 821-33. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1344-5>.
- Rusmini, Paola, Maria Josefa Polanco, Riccardo Cristofani, Maria Elena Cicardi, Marco Meroni, Mariarita Galbiati, Margherita Piccolella, et al. 2015. « Aberrant Autophagic Response in The Muscle of A Knock-in Mouse Model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy ». *Scientific Reports* 5 (octobre): 15174. <https://doi.org/10.1038/srep15174>.
- Ryter, Stefan W., Suzanne M. Cloonan, et Augustine M. K. Choi. 2013. « Autophagy: A Critical Regulator of Cellular Metabolism and Homeostasis ». *Molecules and Cells* 36 (1): 7-16. <https://doi.org/10.1007/s10059-013-0140-8>.
- Sala, Ambre J., Laura C. Bott, et Richard I. Morimoto. 2017. « Shaping Proteostasis at the Cellular, Tissue, and Organismal Level ». *J Cell Biol* 216 (5): 1231-41. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612111>.
- Salah, Zaidoun, Akram Alian, et Rami I. Aqeilan. 2012. « WW Domain-Containing Proteins: Retrospectives and the Future ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 17 (janvier): 331-48.

- Salaün, Patrick, Yves Rannou, et Claude Prigent. 2008. « Cdk1, Plks, Auroras, and Neks: the mitotic bodyguards ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 617: 41-56.
- Salbreux, Guillaume, Guillaume Charras, et Ewa Paluch. 2012. « Actin cortex mechanics and cellular morphogenesis ». *Trends in Cell Biology* 22 (10): 536-45. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.07.001>.
- Sanbe, Atsushi, Tetsuro Marunouchi, Tsutomu Abe, Yu Tezuka, Mizuki Okada, Sayuri Aoki, Hideki Tsumura, et al. 2013. « Phenotype of Cardiomyopathy in Cardiac-specific Heat Shock Protein B8 K141N Transgenic Mouse ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (13): 8910-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368324>.
- Sánchez-Martín, Pablo, et Masaaki Komatsu. 2018. « P62/SQSTM1 – Steering the Cell through Health and Disease ». *J Cell Sci* 131 (21): jcs222836. <https://doi.org/10.1242/jcs.222836>.
- Sandri, Marco. 2010. « Autophagy in Skeletal Muscle ». *FEBS Letters* 584 (7): 1411-16. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.056>.
- Sandri, Marco, Luisa Coletto, Paolo Grumati, et Paolo Bonaldo. 2013. « Misregulation of Autophagy and Protein Degradation Systems in Myopathies and Muscular Dystrophies ». *J Cell Sci* 126 (23): 5325-33. <https://doi.org/10.1242/jcs.114041>.
- Sansregret, Laurent, et Charles Swanton. 2017. « The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 7 (1): a028373. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028373>.
- Santamaría, David, Cédric Barrière, Antonio Cerqueira, Sarah Hunt, Claudine Tardy, Kathryn Newton, Javier F. Cáceres, Pierre Dubus, Marcos Malumbres, et Mariano Barbacid. 2007. « Cdk1 Is Sufficient to Drive the Mammalian Cell Cycle ». *Nature* 448 (7155): 811-15. <https://doi.org/10.1038/nature06046>.
- Santoro, Antonietta, Vanessa Nicolin, Fulvio Florenzano, Alessandra Rosati, Mario Capunzo, et Stefania L. Nori. 2017. « BAG3 Is Involved in Neuronal Differentiation and Migration ». *Cell and Tissue Research* 368 (2): 249-58. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2570-7>.
- Sato, Tatsuhiro, Junko Ishii, Yuki Ota, Eri Sasaki, Yoshio Shibagaki, et Seisuke Hattori. 2016. « Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Complex 2 Regulates Filamin A-Dependent Focal Adhesion Dynamics and Cell Migration ». *Genes to Cells* 21 (6): 579-93. <https://doi.org/10.1111/gtc.12366>.
- Schiffhauer, Eric S., Tianzhi Luo, Krithika Mohan, Vasudha Srivastava, Xuyu Qian, Eric R. Griffis, Pablo A. Iglesias, et Douglas N. Robinson. 2016. « Mechanoaccumulative Elements of the Mammalian Actin Cytoskeleton ». *Current biology : CB* 26 (11): 1473-79. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.04.007>.
- Schiffhauer, Eric S., et Douglas N. Robinson. 2017. « Mechanochemical Signaling Directs Cell-Shape Change ». *Biophysical Journal* 112 (2): 207-14. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.12.015>.
- Schiller, Herbert B., et Reinhard Fässler. 2013. « Mechanosensitivity and Compositional Dynamics of Cell-Matrix Adhesions ». *EMBO Reports* 14 (6): 509-19. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.49>.
- Schmalhofer, Otto, Simone Brabletz, et Thomas Brabletz. 2009. « E-Cadherin, β -Catenin, and ZEB1 in Malignant Progression of Cancer ». *Cancer and Metastasis Reviews* 28 (1-2): 151-66. <https://doi.org/10.1007/s10555-008-9179-y>.
- Schölz, Christian, Brian T. Weinert, Sebastian A. Wagner, Petra Beli, Yasuyuki Miyake, Jun Qi, Lars J. Jensen, et al. 2015. « Acetylation Site Specificities of Lysine Deacetylase Inhibitors in Human Cells ». *Nature Biotechnology* 33 (4): 415-23. <https://doi.org/10.1038/nbt.3130>.
- Schreiber, Anne, et Matthias Peter. 2014. « Substrate Recognition in Selective Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1843 (1): 163-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.019>.
- Seki, Akiko, Judith A. Coppinger, Chang-Young Jang, John R. Yates, et Guowei Fang. 2008. « Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry ». *Science* 320 (5883): 1655-58. <https://doi.org/10.1126/science.1157425>.
- Selcen Duygu, Muntoni Francesco, Burton Barbara K., Pegoraro Elena, Sewry Caroline, Bite Anna V., et Engel Andrew G. 2008. « Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy ». *Annals of Neurology* 65 (1): 83-89. <https://doi.org/10.1002/ana.21553>.
- Semmler, Anna-Lena, Sabrina Sacconi, J. Elisa Bach, Claus Liebe, Jan Bürmann, Rudolf A. Kley, Andreas Ferbert, et al. 2014. « Unusual Multisystemic Involvement and a Novel BAG3 Mutation Revealed by NGS Screening in a Large Cohort of Myofibrillar Myopathies ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 9 (1): 121. <https://doi.org/10.1186/s13023-014-0121-9>.
- Shaid, S., C. H. Brandts, H. Serve, et I. Dikic. 2013. « Ubiquitination and Selective Autophagy ». *Cell Death and Differentiation* 20 (1): 21-30. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.72>.
- Shammas, Sarah L., Christopher A. Waudby, Shuyu Wang, Alexander K. Buell, Tuomas P. J. Knowles, Heath Ecroyd, Mark E. Welland, John A. Carver, Christopher M. Dobson, et Sarah Meehan. 2011.

- « Binding of the Molecular Chaperone AB-Crystallin to A β Amyloid Fibrils Inhibits Fibril Elongation ». *Biophysical Journal* 101 (7): 1681-89. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.07.056>.
- Shan, Bin, Tso-pang Yao, Hong T. Nguyen, Ying Zhuo, Dawn R. Levy, Ross C. Klingsberg, Hui Tao, Michael L. Palmer, Kevin N. Holder, et Joseph A. Lasky. 2008. « Requirement of HDAC6 for Transforming Growth Factor-Beta1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (30): 21065-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802786200>.
- Shao, D., A. Forge, P. M. G. Munro, et M. Bailly. 2006. « Arp2/3 Complex-Mediated Actin Polymerisation Occurs on Specific Pre-Existing Networks in Cells and Requires Spatial Restriction to Sustain Functional Lamellipod Extension ». *Cell Motility* 63 (7): 395-414. <https://doi.org/10.1002/cm.20131>.
- Shao, Hanshuang, James H.-C. Wang, Martin R. Pollak, et Alan Wells. 2010. « α -Actinin-4 Is Essential for Maintaining the Spreading, Motility and Contractility of Fibroblasts ». *PLoS ONE* 5 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013921>.
- Sharifi, Marina N., Erin E. Mowers, Lauren E. Drake, Chris Collier, Hong Chen, Marta Zamora, Stephanie Mui, et Kay F. Macleod. 2016. « Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3 ». *Cell Reports* 15 (8): 1660-72. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.065>.
- Shemetov, A. A., A. S. Seit-Nebi, O. V. Bukach, et N. B. Gusev. 2008. « Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase inhibits chaperone-like activity of human HSP22 in vitro ». *Biochemistry (00062979)* 73 (2): 200-208. <https://doi.org/10.1007/s10541-008-2012-y>.
- Shemetov, Anton A., Alim S. Seit-Nebi, et Nikolai B. Gusev. 2011. « Phosphorylation of Human Small Heat Shock Protein HspB8 (Hsp22) by ERK1 Protein Kinase ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 355 (1-2): 47-55. <https://doi.org/10.1007/s11010-011-0837-y>.
- Sherman, M. Y., et V. L. Gabai. 2015. « Hsp70 in Cancer: Back to the Future ». *Oncogene* 34 (32): 4153-61. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.349>.
- Shi, Huiyong, Haidong Xu, Zengjun Li, Yanan Zhen, Bin Wang, Shoujun Huo, Ruixue Xiao, et Zhongfa Xu. 2016. « BAG3 Regulates Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Human Colorectal Cancer ». *Tumor Biology* 37 (4): 5591-97. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4403-1>.
- Shi, Xingjuan, Yanjun Yao, Yujue Wang, Yu Zhang, Qinghai Huang, Jun Zhou, Min Liu, et Dengwen Li. 2015. « Cep70 Regulates Microtubule Stability by Interacting with HDAC6 ». *FEBS Letters* 589 (15): 1771-77. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.017>.
- Shimizu, Miho, Mikihiro Tanaka, et Yoriko Atomi. 2016. « Small Heat Shock Protein AB-Crystallin Controls Shape and Adhesion of Glioma and Myoblast Cells in the Absence of Stress ». *PloS One* 11 (12): e0168136. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168136>.
- Shin, Jaekyoon. 1998. « P62 and the Sequestosome, a Novel Mechanism for Protein Metabolism ». *Archives of Pharmacal Research* 21 (6): 629-33. <https://doi.org/10.1007/BF02976748>.
- Siller, Karsten H., et Chris Q. Doe. 2009. « Spindle Orientation during Asymmetric Cell Division ». *Nature Cell Biology* 11 (4): 365-74. <https://doi.org/10.1038/ncb0409-365>.
- Simons, M., et G. Walz. 2006. « Polycystic kidney disease: Cell division without a c(1)ue? ». *Kidney International* 70 (5): 854-64. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001534>.
- Sivakumar, Sushama, et Gary J. Gorbisky. 2015. « Spatiotemporal Regulation of the Anaphase-Promoting Complex in Mitosis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 16 (2): 82-94. <https://doi.org/10.1038/nrm3934>.
- Smith, C. C., Y. X. Yu, M. Kulka, et L. Aurelian. 2000. « A Novel Human Gene Similar to the Protein Kinase (PK) Coding Domain of the Large Subunit of Herpes Simplex Virus Type 2 Ribonucleotide Reductase (ICP10) Codes for a Serine-Threonine PK and Is Expressed in Melanoma Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (33): 25690-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002140200>.
- Söderberg, Ola, Mats Gullberg, Malin Jarvius, Karin Ridderstråle, Karl-Johan Leuchowius, Jonas Jarvius, Kenneth Wester, et al. 2006. « Direct Observation of Individual Endogenous Protein Complexes in Situ by Proximity Ligation ». *Nature Methods* 3 (12): 995-1000. <https://doi.org/10.1038/nmeth947>.
- Solinet, Sara, Kazi Mahmud, Shannon F. Stewman, Khaled Ben El Kadhi, Barbara Decelle, Lama Talje, Ao Ma, Benjamin H. Kwok, et Sébastien Carreno. 2013. « The Actin-Binding ERM Protein Moesin Binds to and Stabilizes Microtubules at the Cell Cortex ». *J Cell Biol* 202 (2): 251-60. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304052>.
- Song, Fei, Geng Wang, Zhifang Ma, Yuebing Ma, Yingying Wang, Fei Song, Geng Wang, Zhifang Ma, Yuebing Ma, et Yingying Wang. 2017. « Silencing of BAG3 inhibits the epithelial-mesenchymal

- transition in human cervical cancer ». *Oncotarget* 8 (56): 95392-400. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20726>.
- Sontag, Emily Mitchell, Rahul S. Samant, et Judith Frydman. 2017. « Mechanisms and Functions of Spatial Protein Quality Control ». *Annual Review of Biochemistry* 86 (juin): 97-122. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014616>.
- Sorce, Barbara, Carlos Escobedo, Yusuke Toyoda, Martin P. Stewart, Cedric J. Cattin, Richard Newton, Indranil Banerjee, et al. 2015. « Mitotic Cells Contract Actomyosin Cortex and Generate Pressure to Round against or Escape Epithelial Confinement ». *Nature Communications* 6 (novembre): 8872. <https://doi.org/10.1038/ncomms9872>.
- Stewart, Martin P., Jonne Helenius, Yusuke Toyoda, Subramanian P. Ramanathan, Daniel J. Muller, et Anthony A. Hyman. 2011. « Hydrostatic Pressure and the Actomyosin Cortex Drive Mitotic Cell Rounding ». *Nature* 469 (7329): 226-30. <https://doi.org/10.1038/nature09642>.
- Stoevring, Birgitte, Jette L. Frederiksen, et Michael Christiansen. 2007. « CRYAB Promoter Polymorphisms: Influence on Multiple Sclerosis Susceptibility and Clinical Presentation ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 375 (1-2): 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.06.017>.
- Strausfeld, U., J. C. Labbé, D. Fesquet, J. C. Cavadore, A. Picard, K. Sadhu, P. Russell, et M. Dorée. 1991. « Dephosphorylation and Activation of a P34cdc2/Cyclin B Complex in Vitro by Human CDC25 Protein ». *Nature* 351 (6323): 242-45. <https://doi.org/10.1038/351242a0>.
- Studer, Sonja, Markus Obrist, Nicolas Lentze, et Franz Narberhaus. 2002. « A Critical Motif for Oligomerization and Chaperone Activity of Bacterial Alpha-Heat Shock Proteins ». *European Journal of Biochemistry* 269 (14): 3578-86.
- Stumptner, Cornelia, Hans Heid, Andrea Fuchsbichler, Hubert Hauser, Hans-Jörg Mischinger, Kurt Zatloukal, et Helmut Denk. 1999. « Analysis of Intracytoplasmic Hyaline Bodies in a Hepatocellular Carcinoma: Demonstration of P62 as Major Constituent ». *The American Journal of Pathology* 154 (6): 1701-10. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65426-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65426-0).
- Stürner, Elisabeth, et Christian Behl. 2017. « The Role of the Multifunctional BAG3 Protein in Cellular Protein Quality Control and in Disease ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (juin). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00177>.
- Sudol, Marius, et Tony Hunter. 2000. « NeW Wrinkles for an Old Domain ». *Cell* 103 (7): 1001-4. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00203-8).
- Sun, Daxiao, Rongbo Wu, Jingxiang Zheng, Pilog Li, et Li Yu. 2018. « Polyubiquitin Chain-Induced P62 Phase Separation Drives Autophagic Cargo Segregation ». *Cell Research* 28 (4): 405-15. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0017-7>.
- Sun, Xiaoyan, Hongsheng Qi, Xiuzhen Zhang, Li Li, Jiaping Zhang, Qunli Zeng, George S. Laszlo, et al. 2018. « Src activation decouples cell division orientation from cell geometry in mammalian cells ». *Biomaterials* 170 (juillet): 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.03.052>.
- Suss, Ohad, et Dana Reichmann. 2015. « Protein Plasticity Underlines Activation and Function of ATP-Independent Chaperones ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 2. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2015.00043>.
- Suzuki, Katsuo, et Kazuhide Takahashi. 2003. « Reduced Cell Adhesion during Mitosis by Threonine Phosphorylation of B1 Integrin ». *Journal of Cellular Physiology* 197 (2): 297-305. <https://doi.org/10.1002/jcp.10354>.
- Suzuki, Mariko, Rie Matsushima-Nishiwaki, Gen Kuroyanagi, Noriko Suzuki, Reika Takamatsu, Tatsuro Furui, Naoki Yoshimi, Osamu Kozawa, et Ken-ichirou Morishige. 2015. « Regulation by Heat Shock Protein 22 (HSPB8) of Transforming Growth Factor- α -Induced Ovary Cancer Cell Migration ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 571 (avril): 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.02.030>.
- Suzuki, Miwa, Masahiro Iwasaki, Asuka Sugio, Akinori Hishiya, Ryoichi Tanaka, Toshiaki Endo, Shinichi Takayama, et Tsuyoshi Saito. 2011. « BAG3 (BCL2-associated athanogene 3) interacts with MMP-2 to positively regulate invasion by ovarian carcinoma cells ». *Cancer Letters* 303 (1): 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.01.019>.
- Svitkina, Tatyana. 2018. « The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (1): a018267. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018267>.

- Svitkina, Tatyana M., et Gary G. Borisy. 1999. « Arp2/3 Complex and Actin Depolymerizing Factor/Cofilin in Dendritic Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia ». *The Journal of Cell Biology* 145 (5): 1009-26. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.5.1009>.
- Szeto, Sandy G. Y., Elizabeth C. Williams, Adam D. Rudner, et Jonathan M. Lee. 2015. « Phosphorylation of filamin A by Cdk1 regulates filamin A localization and daughter cell separation ». *Experimental Cell Research* 330 (2): 248-66. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.10.024>.
- Takayama, Shinichi, Zhihua Xie, et John C. Reed. 1999. « An Evolutionarily Conserved Family of Hsp70/Hsc70 Molecular Chaperone Regulators ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (2): 781-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.781>.
- Takizawa, Catherine G, et David O Morgan. 2000. « Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1–Cdk1 and Cdc25C ». *Current Opinion in Cell Biology* 12 (6): 658-65. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00149-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00149-6).
- Tame, Mihoko, Jonne Raaijmakers, Bram van den Broek, Arne Lindqvist, Kees Jalink, et René H. Medema. 2014. « Astral microtubules control redistribution of dynein at the cell cortex to facilitate spindle positioning ». *Cell Cycle* 13 (7): 1162-70. <https://doi.org/10.4161/cc.28031>.
- Tan, Jeanne M. M., Esther S. P. Wong, Donald S. Kirkpatrick, Olga Pletnikova, Han Seok Ko, Shiam-Peng Tay, Michelle W. L. Ho, et al. 2008. « Lysine 63-Linked Ubiquitination Promotes the Formation and Autophagic Clearance of Protein Inclusions Associated with Neurodegenerative Diseases ». *Human Molecular Genetics* 17 (3): 431-39. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm320>.
- Taneja, Nilay, Aidan M. Fenix, Lindsay Rathbun, Bryan A. Millis, Matthew J. Tyska, Heidi Hehnly, et Dylan T. Burnette. 2016. « Focal Adhesions Control Cleavage Furrow Shape and Spindle Tilt during Mitosis ». *Scientific Reports* 6: 29846. <https://doi.org/10.1038/srep29846>.
- Tang, Bei-sha, Guo-hua Zhao, Wei Luo, Kun Xia, Fang Cai, Qian Pan, Ru-xu Zhang, et al. 2005. « Small Heat-Shock Protein 22 Mutated in Autosomal Dominant Charcot-Marie-Tooth Disease Type 2L ». *Human Genetics* 116 (3): 222-24. <https://doi.org/10.1007/s00439-004-1218-3>.
- Taniguchi, Koji, Shinichiro Yamachika, Feng He, et Michael Karin. 2016. « P62/SQSTM1—Dr. Jekyll and Mr. Hyde That Prevents Oxidative Stress but Promotes Liver Cancer ». *FEBS Letters* 590 (15): 2375-97. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12301>.
- Tardieux, Isabelle, Ivan Baines, Malgorzata Mossakowska, et Gary E. Ward. 1998. « Actin-binding proteins of invasive malaria parasites and the regulation of actin polymerization by a complex of 32/34-kDa proteins associated with heat shock protein 70kDa ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 93 (2): 295-308. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00044-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00044-9).
- Taylor, Ryan P., et Ivor J. Benjamin. 2005. « Small Heat Shock Proteins: A New Classification Scheme in Mammals ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 38 (3): 433-44. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.12.014>.
- Telles, Elphine, Mansa Gurjar, Ketaki Ganti, Dipika Gupta, et Sorab N. Dalal. 2011. « Filamin A stimulates cdc25C function and promotes entry into mitosis ». *Cell Cycle* 10 (5): 776-82. <https://doi.org/10.4161/cc.10.5.14954>.
- Terasima, T., et L. J. Tolmach. 1963. « Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells ». *Experimental Cell Research* 30 (2): 344-62. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(63\)90306-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(63)90306-9).
- Théry, Manuel, et Michel Bornens. 2006. « Cell Shape and Cell Division ». *Current Opinion in Cell Biology* 18 (6): 648-57. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.10.001>.
- Théry, Manuel, et Michel Bornens. 2008. « Get round and stiff for mitosis ». *HFSP Journal* 2 (2): 65-71. <https://doi.org/10.2976/1.2895661>.
- Théry, Manuel, Victor Racine, Anne Pépin, Matthieu Piel, Yong Chen, Jean-Baptiste Sibarita, et Michel Bornens. 2005. « The Extracellular Matrix Guides the Orientation of the Cell Division Axis ». *Nature Cell Biology* 7 (10): 947-53. <https://doi.org/10.1038/ncb1307>.
- Timofeev, Oleg, Onur Cizmecioglu, Florian Settele, Tore Kempf, et Ingrid Hoffmann. 2010. « Cdc25 Phosphatases Are Required for Timely Assembly of CDK1-Cyclin B at the G2/M Transition ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (22): 16978-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.096552>.
- Tojkander, Sari, Gergana Gateva, et Pekka Lappalainen. 2012. « Actin Stress Fibers – Assembly, Dynamics and Biological Roles ». *J Cell Sci* 125 (8): 1855-64. <https://doi.org/10.1242/jcs.098087>.
- Tolias, Kimberley F., Joseph G. Duman, et Kyongmi Um. 2011. « Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins ». *Progress in Neurobiology* 94 (2): 133-48. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.04.011>.

- Tomar, Alok, Christine Lawson, Majid Ghassemian, et David D. Schlaepfer. 2012. « Cortactin as a Target for FAK in the Regulation of Focal Adhesion Dynamics ». *PLoS ONE* 7 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044041>.
- Torvaldson, Elin, Vitaly Kochin, et John E. Eriksson. 2015. « Phosphorylation of lamins determine their structural properties and signaling functions ». *Nucleus* 6 (3): 166-71. <https://doi.org/10.1080/19491034.2015.1017167>.
- Toyoda, Yusuke, Cedric J. Cattin, Martin P. Stewart, Ina Poser, Mirko Theis, Teymuraz V. Kurzchalia, Frank Buchholz, Anthony A. Hyman, et Daniel J. Müller. 2017. « Genome-Scale Single-Cell Mechanical Phenotyping Reveals Disease-Related Genes Involved in Mitotic Rounding ». *Nature Communications* 8 (1): 1266. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01147-6>.
- Toyoshima, Fumiko, et Eisuke Nishida. 2007. « Integrin-mediated Adhesion Orients the Spindle Parallel to the Substratum in an EB1- and Myosin X-dependent Manner ». *The EMBO Journal* 26 (6): 1487-98. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601599>.
- Tran, Andy Dong-Anh, Timothy P. Marmo, Ambar A. Salam, Sally Che, Erik Finkelstein, Rafi Kabarriti, Harry S. Xenias, et al. 2007. « HDAC6 Deacetylation of Tubulin Modulates Dynamics of Cellular Adhesions ». *Journal of Cell Science* 120 (Pt 8): 1469-79. <https://doi.org/10.1242/jcs.03431>.
- Truong, Tiffany, Hengameh Shams, et Mohammad R. K. Mofrad. 2015. « Mechanisms of Integrin and Filamin Binding and Their Interplay with Talin during Early Focal Adhesion Formation ». *Integrative Biology* 7 (10): 1285-96. <https://doi.org/10.1039/C5IB00133A>.
- Tsichlis, Philip N., Maria Hatzia Apostolou, et Philip W. Hinds. 2007. « Timing Is Everything: Regulation of Cdk1 and Aneuploidy ». *Developmental Cell* 12 (4): 477-79. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.010>.
- Tuloup-Minguez, Véronique, ahmed Hamaï, Anne Greffard, Valérie Nicolas, Patrice Codogno, et Joëlle Botti. 2013. « Autophagy modulates cell migration and $\beta 1$ integrin membrane recycling ». *Cell Cycle* 12 (20): 3317-28. <https://doi.org/10.4161/cc.26298>.
- Tyanova, Stefka, Jürgen Cox, Jesper Olsen, Matthias Mann, et Dmitrij Frishman. 2013. « Phosphorylation Variation during the Cell Cycle Scales with Structural Propensities of Proteins ». *PLOS Computational Biology* 9 (1): e1002842. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002842>.
- Ulbricht, Anna, Verena Arndt, et Jörg Höhfeld. 2013. « Chaperone-Assisted Proteostasis Is Essential for Mechanotransduction in Mammalian Cells ». *Communicative & Integrative Biology* 6 (4): e24925. <https://doi.org/10.4161/cib.24925>.
- Ulbricht, Anna, Felix J. Eppler, Victor E. Tapia, Peter F. M. van der Ven, Nico Hampe, Nils Hersch, Padmanabhan Vakeel, et al. 2013. « Cellular Mechanotransduction Relies on Tension-Induced and Chaperone-Assisted Autophagy ». *Current Biology: CB* 23 (5): 430-35. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.01.064>.
- Ulbricht, Anna, Sebastian Gehlert, Barbara Leciejewski, Thorsten Schiffer, Wilhelm Bloch, et Jörg Höhfeld. 2015. « Induction and adaptation of chaperone-assisted selective autophagy CASA in response to resistance exercise in human skeletal muscle ». *Autophagy* 11 (3): 538-46. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017186>.
- Ulbricht, Anna, et Jörg Höhfeld. 2013. « Tension-Induced Autophagy: May the Chaperone Be with You ». *Autophagy* 9 (6): 920-22. <https://doi.org/10.4161/auto.24213>.
- Ungelenk, Sophia, Fatemeh Moayed, Chi-Ting Ho, Tomas Grousl, Annette Scharf, Alireza Mashaghi, Sander Tans, Matthias P. Mayer, Axel Mogk, et Bernd Bukau. 2016. « Small heat shock proteins sequester misfolding proteins in near-native conformation for cellular protection and efficient refolding ». *Nature Communications* 7 (novembre). <https://doi.org/10.1038/ncomms13673>.
- Urano, T., J. Liu, P. Zhang, null Fan Yx, C. Egile, R. Li, S. C. Mueller, et X. Zhan. 2001. « Activation of Arp2/3 Complex-Mediated Actin Polymerization by Cortactin ». *Nature Cell Biology* 3 (3): 259-66. <https://doi.org/10.1038/35060051>.
- Urano, Takehito, Jiali Liu, Peijun Zhang, Ying-xin Fan, Coumaran Egile, Rong Li, Susette C. Mueller, et Xi Zhan. 2001. « Activation of Arp2/3 Complex-Mediated Actin Polymerization by Cortactin ». *Nature Cell Biology* 3 (3): 259-66. <https://doi.org/10.1038/35060051>.
- Vabulas, R. Martin, et F. Ulrich Hartl. 2011. « Aberrant protein interactions in amyloid disease ». *Cell Cycle* 10 (10): 1512-13. <https://doi.org/10.4161/cc.10.10.15432>.
- Vadlamudi, Ratna K., Insil Joung, Jack L. Strominger, et Jaekyoon Shin. 1996. « P62, a Phosphotyrosine-Independent Ligand of the SH2 Domain of P56lck, Belongs to a New Class of Ubiquitin-Binding

- Proteins ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20235-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20235>.
- Valencia, Tania, Ji Young Kim, Shadi Abu-Baker, Jorge Moscat-Pardos, Christopher S. Ahn, Miguel Reina-Campos, Angeles Duran, et al. 2014. « Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-mTORC1 signaling promotes inflammation and tumorigenesis ». *Cancer cell* 26 (1): 121-35. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.004>.
- Varlet, Alice Anaïs, Margit Fuchs, Carole Luthold, Herman Lambert, Jacques Landry, et Josée N. Lavoie. 2017. « Fine-Tuning of Actin Dynamics by the HSPB8-BAG3 Chaperone Complex Facilitates Cytokinesis and Contributes to Its Impact on Cell Division ». *Cell Stress & Chaperones*, mars. <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0780-2>.
- Vassilev, Lyubomir T. 2006. « Cell Cycle Synchronization at the G2/M Phase Border by Reversible Inhibition of CDK1 ». *Cell Cycle* 5 (22): 2555-56. <https://doi.org/10.4161/cc.5.22.3463>.
- Vassilev, Lyubomir T., Christian Tovar, Shaoqing Chen, Dejan Knezevic, Xiaolan Zhao, Hongmao Sun, David C. Heimbros, et Li Chen. 2006. « Selective Small-Molecule Inhibitor Reveals Critical Mitotic Functions of Human CDK1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (28): 10660-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600447103>.
- Verschuure, Pauline. 2003. « Expression of Small Heat Shock Proteins HspB2, HspB8, Hsp20 and CvHsp in Different Tissues of the Perinatal Developing Pig ». *European Journal of Cell Biology* 82 (10): 523-30. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00337>.
- Verschuure, Pauline, Yvonne Croes, Paul R. L. A. van den IJssel, Roy A. Quinlan, Wilfried W. de Jong, et Wilbert C. Boelens. 2002. « Translocation of Small Heat Shock Proteins to the Actin Cytoskeleton upon Proteasomal Inhibition ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34 (2): 117-28. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1493>.
- Vicente-Manzanares, Miguel, Xuefei Ma, Robert S. Adelstein, et Alan Rick Horwitz. 2009. « Non-Muscle Myosin II Takes Centre Stage in Cell Adhesion and Migration ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (11): 778-90. <https://doi.org/10.1038/nrm2786>.
- Vigneron, Suzanne, Perle Robert, Khaled Hached, Lena Sundermann, Sophie Charrasse, Jean-Claude Labbé, Anna Castro, et Thierry Lorca. 2016. « The Master Greatwall Kinase, a Critical Regulator of Mitosis and Meiosis ». *International Journal of Developmental Biology* 60 (7-8-9): 245-54. <https://doi.org/10.1387/ijdb.160155tl>.
- Vigneron, Suzanne, Lena Sundermann, Jean-Claude Labbé, Lionel Pintard, Ovidiu Radulescu, Anna Castro, et Thierry Lorca. 2018. « Cyclin A-Cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry ». *Developmental Cell* 45 (5): 637-650.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.005>.
- Vilmos, Péter, Ildikó Kristó, Szilárd Szikora, Ferenc Jankovics, Tamás Lukácsovich, Beáta Kari, et Miklós Erdélyi. 2016. « The Actin-Binding ERM Protein Moesin Directly Regulates Spindle Assembly and Function during Mitosis ». *Cell Biology International* 40 (6): 696-707. <https://doi.org/10.1002/cbin.10607>.
- Vodicska, Barbara, Berati Cerikan, Elmar Schiebel, et Ingrid Hoffmann. 2018. « MISP Regulates the IQGAP1/Cdc42 Complex to Collectively Orchestrate Spindle Orientation and Mitotic Progression ». *Scientific Reports* 8 (1): 6330. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24682-8>.
- Vuori, Kristiina, et Erkki Ruoslahti. 1995. « Tyrosine Phosphorylation of P130Cas and Cortactin Accompanies Integrin-Mediated Cell Adhesion to Extracellular Matrix ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (38): 22259-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22259>.
- Walcott, Sam, et Sean X. Sun. 2010. « A Mechanical Model of Actin Stress Fiber Formation and Substrate Elasticity Sensing in Adherent Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (17): 7757-62. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912739107>.
- Wang, Gang, Qing Jiang, et Chuanmao Zhang. 2014. « The Role of Mitotic Kinases in Coupling the Centrosome Cycle with the Assembly of the Mitotic Spindle ». *J Cell Sci* 127 (19): 4111-22. <https://doi.org/10.1242/jcs.151753>.
- Wang, HaiYang, Jing Guo, ZiLi Lin, Suk Namgoong, Jeong Su Oh, et Nam-Hyung Kim. 2017. « Filamin A is required for spindle migration and asymmetric division in mouse oocytes ». *The FASEB Journal* 31 (8): 3677-88. <https://doi.org/10.1096/fj.201700056R>.
- Wang, Peng, Myreille Larouche, Karine Normandin, David Kachaner, Haytham Mehsen, Gregory Emery, et Vincent Archambault. 2016. « Spatial regulation of greatwall by Cdk1 and PP2A-Tws in the cell cycle ». *Cell Cycle* 15 (4): 528-39. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1127476>.

- Wang, Wenqi, Yang Liu, et Kan Liao. 2011. «Tyrosine phosphorylation of cortactin by the FAK-Src complex at focal adhesions regulates cell motility ». *BMC Cell Biology* 12 (novembre): 49. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-49>.
- Wang, Yi-Long, Hui Chen, Yi-Qun Zhan, Rong-Hua Yin, Chang-Yan Li, Chang-Hui Ge, Miao Yu, et Xiao-Ming Yang. 2016. «EWSR1 regulates mitosis by dynamically influencing microtubule acetylation ». *Cell Cycle* 15 (16): 2202-15. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1200774>.
- Watabe, Masahiko, et Toshio Nakaki. 2011. «Protein Kinase CK2 Regulates the Formation and Clearance of Aggresomes in Response to Stress ». *J Cell Sci* 124 (9): 1519-32. <https://doi.org/10.1242/jcs.081778>.
- Watanabe, Yoshihisa, Atsushi Tsujimura, Katsutoshi Taguchi, et Masaki Tanaka. 2016. «HSF1 stress response pathway regulates autophagy receptor SQSTM1/p62-associated proteostasis ». *Autophagy* 13 (1): 133-48. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1248018>.
- Weaver, A. M., A. V. Karginov, A. W. Kinley, S. A. Weed, Y. Li, J. T. Parsons, et J. A. Cooper. 2001. «Cortactin Promotes and Stabilizes Arp2/3-Induced Actin Filament Network Formation ». *Current Biology: CB* 11 (5): 370-74.
- Webb, Donna J., Karen Donais, Leanna A. Whitmore, Sheila M. Thomas, Christopher E. Turner, J. Thomas Parsons, et Alan F. Horwitz. 2004. «FAK–Src Signalling through Paxillin, ERK and MLCK Regulates Adhesion Disassembly ». *Nature Cell Biology* 6 (2): 154-61. <https://doi.org/10.1038/ncb1094>.
- Welburn, Julie P. I., et A. Arockia Jeyaprakash. 2018. «Mechanisms of Mitotic Kinase Regulation: A Structural Perspective ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6 (février). <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00006>.
- Wennerberg, Krister, Kent L. Rossman, et Channing J. Der. 2005. «The Ras Superfamily at a Glance ». *J Cell Sci* 118 (5): 843-46. <https://doi.org/10.1242/jcs.01660>.
- Werner, Achim, Andrea Disanza, Nina Reifenberger, Gregor Habeck, Janina Becker, Matthew Calabrese, Henning Urlaub, et al. 2013. «SCF^{Fbxw5} Mediates Transient Degradation of Actin Remodeller Eps8 to Allow Proper Mitotic Progression ». *Nature Cell Biology* 15 (2): 179-88. <https://doi.org/10.1038/ncb2661>.
- Wettstein, G., P. S. Bellaye, O. Micheau, et Ph Bonniaud. 2012. «Small heat shock proteins and the cytoskeleton: An essential interplay for cell integrity? » *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Directed Issue: Small HSPs in Physiology and Pathology, 44 (10): 1680-86. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.024>.
- Wilhelmus, Micha M. M., Wilbert C. Boelens, Irene Otte-Höller, Bram Kamps, Benno Kusters, Marion L. C. Maat-Schieman, Robert M. W. de Waal, et Marcel M. Verbeek. 2006. «Small Heat Shock Protein HspB8: Its Distribution in Alzheimer's Disease Brains and Its Inhibition of Amyloid-Beta Protein Aggregation and Cerebrovascular Amyloid-Beta Toxicity ». *Acta Neuropathologica* 111 (2): 139-49. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-0030-z>.
- Wolff, Suzanne, Jonathan S. Weissman, et Andrew Dillin. 2014. «Differential Scales of Protein Quality Control ». *Cell* 157 (1): 52-64. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.007>.
- Woodruff, Jeffrey B. 2018. «Assembly of Mitotic Structures through Phase Separation ». *Journal of Molecular Biology*, Phase Separation in Biology and Disease, 430 (23): 4762-72. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.04.041>.
- Wooten, Marie W., Thangiah Geetha, J. Ramesh Babu, M. Lamar Seibenhener, Junmin Peng, Nancy Cox, Maria-T. Diaz-Meco, et Jorge Moscat. 2008. «Essential Role of Sequestosome 1/P62 in Regulating Accumulation of Lys63-Ubiquitinated Proteins ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (11): 6783-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709496200>.
- Wurzer, Bettina, Gabriele Zaffagnini, Dorotea Fracchiolla, Eleonora Turco, Christine Abert, Julia Romanov, et Sascha Martens. 2015. «Oligomerization of P62 Allows for Selection of Ubiquitinated Cargo and Isolation Membrane during Selective Autophagy ». *ELife* 4 (septembre): e08941. <https://doi.org/10.7554/eLife.08941>.
- Xiao, Heng, Shaobing Cheng, Rongliang Tong, Zheng Lv, Chaofeng Ding, Chengli Du, Haiyang Xie, Lin Zhou, Jian Wu, et Shusen Zheng. 2014. «BAG3 Regulates Epithelial–Mesenchymal Transition and Angiogenesis in Human Hepatocellular Carcinoma ». *Laboratory Investigation* 94 (3): 252-61. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.151>.
- Xu, Zhe, Kourtney Graham, Molly Foote, Fengshan Liang, Raed Rizkallah, Myra Hurt, Yanchang Wang, Yuying Wu, et Yi Zhou. 2013. «14-3-3 Protein Targets Misfolded Chaperone-Associated Proteins to Aggresomes ». *J Cell Sci* 126 (18): 4173-86. <https://doi.org/10.1242/jcs.126102>.

- Yamakita, Yoshihiko, Go Totsukawa, Shigeko Yamashiro, David Fry, Xiaoe Zhang, Steven K. Hanks, et Fumio Matsumura. 1999. «Dissociation of FAK/P130CAS/c-Src Complex during Mitosis: Role of Mitosis-Specific Serine Phosphorylation of FAK». *The Journal of Cell Biology* 144 (2): 315-24. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.2.315>.
- Yan, Jin, Michael Lamar Seibenhener, Luis Calderilla-Barbosa, Maria-Theresa Diaz-Meco, Jorge Moscat, Jianxiong Jiang, Marie W. Wooten, et Michael C. Wooten. 2013. «SQSTM1/P62 Interacts with HDAC6 and Regulates Deacetylase Activity». *PLoS One* 8 (9): e76016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076016>.
- Ye, Nannan, Deepika Verma, Fanjie Meng, Michael W. Davidson, Kevin Suffoletto, et Susan Z. Hua. 2014. «Direct observation of α -actinin tension and recruitment at focal adhesions during contact growth». *Experimental Cell Research* 327 (1): 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.07.026>.
- Yeung, Kay T., et Jing Yang. 2017. «Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis». *Molecular Oncology* 11 (1): 28-39. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12017>.
- Yoshii, Saori R., et Noboru Mizushima. 2017. «Monitoring and Measuring Autophagy». *International Journal of Molecular Sciences* 18 (9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091865>.
- Young, Jason C, José M Barral, et F Ulrich Hartl. 2003. «More than folding: localized functions of cytosolic chaperones». *Trends in Biochemical Sciences* 28 (10): 541-47. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2003.08.009>.
- Yu, Y. X., A. Heller, T. Liehr, C. C. Smith, et L. Aurelian. 2001. «Expression Analysis and Chromosome Location of a Novel Gene (H11) Associated with the Growth of Human Melanoma Cells». *International Journal of Oncology* 18 (5): 905-11.
- Yunoki, Tatsuya, Yoshiaki Tabuchi, Atsushi Hayashi, et Takashi Kondo. 2015. «BAG3 Protects against Hyperthermic Stress by Modulating NF- κ B and ERK Activities in Human Retinoblastoma Cells». *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 253 (3): 399-407. <https://doi.org/10.1007/s00417-014-2874-1>.
- Zaffagnini, Gabriele, Adriana Savova, Alberto Danieli, Julia Romanov, Shirley Tremel, Michael Ebner, Thomas Peterbauer, et al. 2018. «P62 Filaments Capture and Present Ubiquitinated Cargos for Autophagy». *The EMBO Journal* 37 (5): e98308. <https://doi.org/10.15252/embj.201798308>.
- Zatloukal, Kurt, Cornelia Stumptner, Andrea Fuchsichler, Hans Heid, Martina Schnoelzer, Lukas Kenner, Reinhold Kleinert, Marco Prinz, Adriano Aguzzi, et Helmut Denk. 2002. «P62 Is a Common Component of Cytoplasmic Inclusions in Protein Aggregation Diseases». *The American Journal of Pathology* 160 (1): 255-63. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64369-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64369-6).
- Zhan, Zhenzhen, Xuefeng Xie, Hao Cao, Xiaohui Zhou, Xu Dong Zhang, Huimin Fan, et Zhongmin Liu. 2014. «Autophagy facilitates TLR4- and TLR3-triggered migration and invasion of lung cancer cells through the promotion of TRAF6 ubiquitination». *Autophagy* 10 (2): 257-68. <https://doi.org/10.4161/auto.27162>.
- Zhang, Linlin, Shanshan Liu, Ningning Liu, Yong Zhang, Min Liu, Dengwen Li, Edward Seto, Tso-Pang Yao, Wenqing Shui, et Jun Zhou. 2015. «Proteomic identification and functional characterization of MYH9, Hsc70, and DNAJA1 as novel substrates of HDAC6 deacetylase activity». *Protein & Cell* 6 (1): 42-54. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0102-8>.
- Zhang, Xiaohong, Zhigang Yuan, Yingtao Zhang, Sarah Yong, Alexis Salas-Burgos, John Koomen, Nancy Olashaw, et al. 2007. «HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin». *Molecular Cell* 27 (2): 197-213. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.033>.
- Zheng, Ge, et Hongtao Yu. 2018. «Cyclin A Turns on Bora to Light the Path to Mitosis». *Developmental Cell* 45 (5): 542-43. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.017>.
- Zheng, Zhen, Qingwen Wan, Jing Liu, Huabin Zhu, Xiaogang Chu, Quansheng Du, et Xueliang Zhu. 2013. «Evidence for dynein and astral microtubule–mediated cortical release and transport of Gai/LGN/NuMA complex in mitotic cells». *Molecular Biology of the Cell* 24 (7): 901-13. <https://doi.org/10.1091/mbc.e12-06-0458>.
- Zhou, Qiuhu, Xiaodong Shi, Kaiming Zhang, Chao Shi, Lixin Huang, et Zhenzhan Chang. 2016. «The Function of Ile-X-Ile Motif in the Oligomerization and Chaperone-Like Activity of Small Heat Shock Protein AgsA at Room Temperature». *The Protein Journal* 35 (6): 401-6. <https://doi.org/10.1007/s10930-016-9681-y>.
- Zhu, Mei, Florian Settele, Sachin Kotak, Luis Sanchez-Pulido, Lena Ehret, Chris P. Ponting, Pierre Gönczy, et Ingrid Hoffmann. 2013. «MISP Is a Novel Plk1 Substrate Required for Proper Spindle

- Orientation and Mitotic Progression ». *J Cell Biol* 200 (6): 773-87. <https://doi.org/10.1083/jcb.201207050>.
- Zhu, Zhihui, et Georg Reiser. 2018. «The small heat shock proteins, especially HspB4 and HspB5 are promising protectants in neurodegenerative diseases ». *Neurochemistry International* 115 (mai): 69-79. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.02.006>.
- Zieve, Gary W., Deborah Turnbull, J. Michael Mullins, et J. Richard McIntosh. 1980. « Production of large numbers of mitotic mammalian cells by use of the reversible microtubule inhibitor Nocodazole: Nocodazole accumulated mitotic cells ». *Experimental Cell Research* 126 (2): 397-405. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(80\)90279-7](https://doi.org/10.1016/0014-4827(80)90279-7).
- Zsiros, Viktoria. 2017. « Autophagy Is the Key Process in the Re-Establishment of the Epitheloid Phenotype during Mesenchymal-Epithelial Transition (MET) ». *Experimental Cell Research* 352 (2): 382-92. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.031>.

Annexe 1: A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis

RESEARCH ARTICLE

A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis

Margit Fuchs^{1,2}, Carole Luthold^{1,2}*, Solenn M. Guilbert^{1,2}*, Alice Anaïs Varlet^{1,2}*, Herman Lambert^{1,2}, Alexandra Jetté^{1,2}, Sabine Elowe^{3,4}, Jacques Landry^{1,2}, Josée N. Lavoie^{1,2}*

1 Centre de Recherche sur le Cancer de l'Université Laval and Département de Biologie Moléculaire, Biochimie Médicale et Pathologie, Université Laval, Quebec, Canada, **2** Oncology, Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval, Quebec, Canada, **3** Reproduction, Perinatal Health and Child Health, Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval, Quebec, Canada, **4** Centre de Recherche sur le Cancer de l'Université Laval and Département de Pédiatrie, Université Laval, Quebec, Canada

* These authors contributed equally to this work.

* josee.lavoie@crhdq.ulaval.ca



CrossMark

click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Fuchs M, Luthold C, Guilbert SM, Varlet AA, Lambert H, Jetté A, et al. (2015) A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis. *PLoS Genet* 11(10): e1005582. doi:10.1371/journal.pgen.1005582

Editor: Tricia R. Serio, The University of Arizona, UNITED STATES

Received: July 6, 2015

Accepted: September 16, 2015

Published: October 23, 2015

Copyright: © 2015 Fuchs et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All the data are contained within the paper and Supporting information.

Funding: This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research Grant no 7088 <http://cchr-irsc.gc.ca/e/193.html>. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interest exist.

Abstract

The co-chaperone BAG3, in complex with the heat shock protein HSPB8, plays a role in protein quality control during mechanical strain. It is part of a multichaperone complex that senses damaged cytoskeletal proteins and orchestrates their seclusion and/or degradation by selective autophagy. Here we describe a novel role for the BAG3-HSPB8 complex in mitosis, a process involving profound changes in cell tension homeostasis. BAG3 is hyperphosphorylated at mitotic entry and localizes to centrosomal regions. BAG3 regulates, in an HSPB8-dependent manner, the timely congression of chromosomes to the metaphase plate by influencing the three-dimensional positioning of the mitotic spindle. Depletion of BAG3 caused defects in cell rounding at metaphase and dramatic blebbing of the cortex associated with abnormal spindle rotations. Similar defects were observed upon silencing of the autophagic receptor p62/SQSTM1 that contributes to BAG3-mediated selective autophagy pathway. Mitotic cells depleted of BAG3, HSPB8 or p62/SQSTM1 exhibited disorganized actin-rich retraction fibres, which are proposed to guide spindle orientation. Proper spindle positioning was rescued in BAG3-depleted cells upon addition of the lectin concanavalin A, which restores cortex rigidity. Together, our findings suggest the existence of a so-far unrecognized quality control mechanism involving BAG3, HSPB8 and p62/SQSTM1 for accurate remodelling of actin-based mitotic structures that guide spindle orientation.

Author Summary

Small heat shock proteins (sHSP/HSPB) form a diverse family of ATP-independent chaperones. Some of them protect the proteome against aggregation during stress and others regulate normal biological processes through ill-defined mechanisms. Interactions between HSPB proteins and elements of the cytoskeleton are increasingly linked to their implication in human degenerative diseases and cancer. For instance, a multichaperone complex containing HSPB8 and its co-chaperone BAG3 would maintain muscle cell integrity by promoting the autophagic clearance of damaged components within F-actin structures. Selective autophagy is a targeted protein degradation mechanism for elimination of damaged organelles and proteins. It may also regulate removal of signaling proteins from their functionally relevant sites during intense remodeling of the cytoskeleton, as it occurs during mitosis. Here, we report a novel role for HSPB8 and BAG3 during mitosis in mammalian cells that involves the autophagic receptor p62/SQSTM1. We show that a reduction of any protein within the HSPB8-BAG3-p62/SQSTM1 signaling axis similarly impairs mitotic progression and chromosome segregation by affecting orientation of the mitotic spindle and assembly of mitotic-specific actin structures. Our findings establish a unique role for HSPB8 in a novel function of BAG3 in mitotic cell division and genome stability, through effect on remodeling of the actin cytoskeleton.

Introduction

Heat shock proteins (HSP) are molecular chaperones with key roles within the so-called proteostasis network. This network is composed of elaborate pathways that allow cells to protect their proteome from aggregation, facilitate the assembly of multi-components complexes, and maintain the integrity of cytoskeleton polymers by eliminating damaged components in response to a variety of stress [1, 2]. As molecular chaperones, HSP detect misfolded proteins and facilitate their refolding, seclusion or degradation. They provide molecular connections with the ubiquitin-proteasome system and the macroautophagy machinery (hereafter named autophagy). In addition, associations of HSP with co-chaperones allow them to be recruited to specific, yet unrelated biological processes [3]. These processes nevertheless share a requirement for dynamic assembly-disassembly of multiprotein complexes at a given location and time, which often involve protein conformational changes. HSP, not surprisingly, are believed to support the phenotype of tumor cells in several ways, mostly as guardians of the proteome against aggregation [4]. Indeed, a proteotoxic stress response typified by upregulation of HSP is proposed to characterize most human malignant cells that experience increased proteomic instability [5].

The small heat shock proteins (HSPB) form a diverse and enigmatic family of chaperones, for which there is currently no single model of mechanism of action [6, 7]. They are viewed as proteins able to confer protection against the deleterious effect of stresses by virtue of their strong induction after stress [8]. Many of them have been shown to act as ATPase-independent holdases to prevent protein aggregation. Noncanonical functions have also been uncovered for ubiquitously expressed HSPB proteins in signaling, with an increasingly recognized connection between HSPB proteins and cytoskeleton elements. We, and others, have shown that the prototypal member of this family heat shock protein B1 (HSPB1/HSP27) performs specialized function in the regulation of actin filaments architecture during both physiological and pathological stimulations [2, 9, 10]. Consistent with this, HSPB1 has been involved in several processes requiring extensive actin polymerization, including tumor cell migration and

invasion [8]. Likewise, heat shock protein B8 (HSPB8/HSP22) forms a stable complex with the co-chaperone BCL2-associated athanogene 3 (BAG3) that has emerged as a key element of cytoskeletal proteostasis in muscle cells [11, 12]. Little is known, however, of the function of this chaperone complex in highly dividing tumor cells where BAG3 has been linked to cytoskeletal dynamics. This is of particular interest given that expression of BAG3 is upregulated in several primary tumors and tumor cell lines of various origins, where it is believed to support the tumor phenotype [13].

BAG3 is one of a family of co-chaperones characterized by a C-terminal BAG domain that binds the HSP70/HSPA ATPase domain to regulate the fate of HSP70 substrates [14]. We have identified BAG3 as an obligate partner of HSPB8 in several cell lines where the depletion of BAG3 leads to a rapid degradation of HSPB8 [15]. Still, the significance of its strong connection to HSPB8 has remained unclear, as BAG3 can function independently of HSPB8 in protein quality control. BAG3 in association with HSP70/HSC70 has been implicated in the aggresome-autophagy pathways. When proteasome-dependent degradation fails, BAG3 would promote the sequestration and targeting of HSP70/HSC70-associated protein aggregates to the aggresome, a perinuclear compartment with high autophagic activity [16–19]. While overexpression of HSPB8 can stimulate autophagy in a BAG3-dependent manner, it seems to be dispensable for the function of BAG3 in the aggresome-autophagy pathways during proteotoxic stress [15, 18, 20].

Recent work suggests that the BAG3-HSPB8 complex could play more specialized function in cytoskeletal proteostasis. In the context of muscle cells, BAG3 and its associated chaperones regulate the structural integrity of the sarcomere—the actin-contraction structure of myofibrils, through effects on localization, stabilization, or clearance of essential actin-binding components [21–23]. Such function is considered to be crucial for maintenance of muscle cell integrity as mutations in BAG3 are associated with the development of muscle disease in children [24, 25]. This suggests that the connection between BAG3 and HSPB8 may serve in some capacity to recruit specialized chaperone systems to biological processes relying on high-order assembly-disassembly of actin. BAG3 is unique among the BAG proteins for the presence of a WW domain and a proline-rich region (PXXP), which might provide BAG3 with the capacity to act as a protein scaffold to integrate chaperone systems with signaling pathways controlling cell remodeling [26, 27]. Both motifs have been shown to contribute to the signaling effects of BAG3 on cell adhesion, actin assembly and motility of tumor cells [28–30]. Nevertheless, the relationship between BAG3-mediated effects on actin dynamics and HSPB8 in dividing cells remains largely unexplored.

We postulate that an HSPB8-dependent function of BAG3 could be mobilized during mitosis to assist in the proper and timely assembly of cytoskeletal structures. Mitosis involves the most dramatic and spectacular changes in the overall structure of a cell. The actin cytoskeleton undergoes extensive remodeling to allow for cell-shape changes that are required for proper transition into and out of mitosis [31]. Therefore, we investigated the relationship between BAG3 and HSPB8 expression, proper progression of cells through mitosis and mitotic reorganization of cellular architecture. We demonstrate the existence of a novel HSPB8-dependent mitotic function of BAG3 that would facilitate the timely remodeling of actin-based mitotic structures that guide spindle orientation and proper chromosome segregation.

Results

BAG3 exhibits mitotic-specific features

In the course of experiments examining BAG3 levels at different steps of the cell cycle, we observed that prolonged treatments of HeLa or 293T cells with nocodazole, a microtubule

poison arresting cells in mitosis, induced a BAG3 supershifted band on SDS-PAGE (Fig 1A). The supershifted band appeared to vanish along with cyclin B1 degradation, suggesting that BAG3 was specifically modified in early mitosis (Fig 1A). Indeed when mitotic HeLa cells were recovered by mitotic shake off, the supershifted band of BAG3 accounted for nearly 100% of the BAG3 detected (Fig 1B, M). Significantly, treatment of mitotic cell extracts with lambda phosphatase (IPP) led to a disappearance of the supershifted band (Fig 1C). The BAG3 supershifted band was not observed in extracts from cells submitted to a variety of stress, including heat shock that rather increased BAG3 levels as expected (Fig 1D). These observations suggested that BAG3 was specifically hyperphosphorylated at mitotic entry.

Time-sequences from confocal microscopy showed that BAG3-GFP localized to centrosomes or the surrounding perinuclear material, as they separated before nuclear envelope breakdown (Fig 1E). At metaphase through anaphase, BAG3-green fluorescent protein (GFP) was found at spindle poles and showed overlapping distribution with the centrosomal marker g-tubulin in fixed cells (Fig 1F). Similarly, endogenous BAG3 was detected at spindle poles of HeLa cells at metaphase and anaphase, using two distinct anti-BAG3 antibodies (lapin 9 [LP9] and LP11; Fig 1G). In agreement with our immunolocalization analyses, BAG3 and its chaperone partner HSPB8 codistributed with the centrosomal markers g-tubulin and centrosome protein of 170 kDa (CEP170) in cellular fractions purified from both asynchronous (AS) and mitotic (M) HeLa cell extracts (Fig 1H, fractions 3–5). Intriguingly, the fast migrating, hypophosphorylated form of BAG3 was abundant in purified centrosomal fractions from mitotic cells, while in post-nuclear supernatants, the supershifted BAG3 band was predominant (Fig 1H, total). This suggested that mitotic-specific phosphorylation of BAG3 could change its localization and potentially its binding partners. The centrosomal enrichment of hypophosphorylated BAG3 was not due to protein dephosphorylation during the purification procedure, as the supershifted BAG3 protein could be recovered in the supernatant fraction (Fig 1H; BAG3 in supernatant). In contrast to HSPB8, HSPB5/aB-crystallin was not found in centrosomal fractions although it was clearly detected in total cell lysates (Fig 1H). The specific changes in phosphorylation of BAG3 and its codistribution with HSPB8 at the centrosome prompted us to investigate a role for the chaperone complex in early mitosis.

BAG3 modulates the progression through early mitosis

To explore a role for BAG3 in mitosis, we first assessed the impact of BAG3 depletion on the progression of unperturbed mitotic events using HeLa cells, which are widely used for mitotic studies. Unsynchronized HeLa cells stably expressing a marker of chromatin GFP-histone 2B (HeLa-GFP-H2B) were transfected with control small interfering RNA (siRNAs), or BAG3-specific siRNAs that achieved >75% depletion of BAG3 in these cells (Fig 2A). Cells were imaged for a period of 48 h to 72 h starting at 40 h after transfection to track the genealogy of cells and establish a mitotic pedigree for families of daughter cells (S1A Fig). By doing so, we found that BAG3 depletion markedly reduced the incidence of cell division. This was reflected by a >5-fold increase in the proportion of cells that divided only once upon depletion of BAG3 relative to control cells (~33% compared to ~6%; n > 64 cells; first 48 h). Consistently, the mean time required to complete a mitotic event, as determined from nuclear envelope breakdown to anaphase onset, was significantly increased in BAG3-depleted cells (~90.33 +/- 3.15 min; n = 515 mitotic events for siBAG3_1; ~90.29 +/- 8.28 min n = 236 mitotic events for siBAG3_2) compared to control cells (~58.90 +/- 1.33 min; n = 884 mitotic events) (Fig 2B). The delay in mitosis was particularly severe in sub-populations of BAG3-depleted cells, which spent between 5 h to 20 h in mitosis. Overall, there was a 2.6- to 3.4-fold increase in the proportion of BAG3-depleted cells that exhibited defective mitosis mainly characterized by an

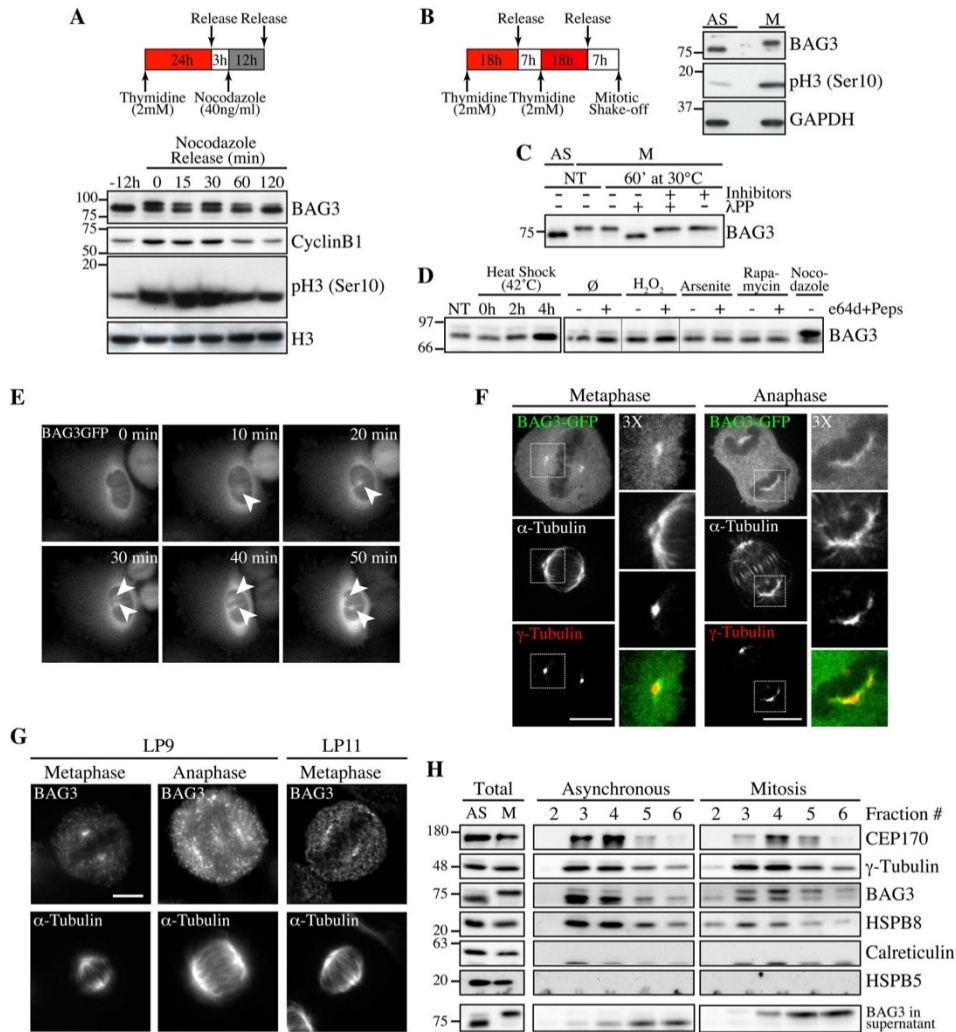


Fig 1. Hyperphosphorylation and centrosomal localization of BAG3 in mitotic cells. (A) HeLa cells were harvested at different times during release from a Thymidine/nocodazole block (time 0). Cell lysates were immunoblotted with the indicated antibodies. (B) Mitotic HeLa-GFP-H2B cells synchronized by the double Thymidine block method and recovered by mitotic shake off were lysed and processed for immunoblotting for BAG3, phospho-histone H3 (p-H3) and GAPDH as loading control; AS, asynchronous; M, mitotic. (C) BAG3 immunoprecipitates (IPs) were prepared from asynchronous HeLa cells (AS) or from HeLa cells arrested in mitosis by incubation with nocodazole for 16 h (M, 400 ng/ml). BAG3 IPs were left untreated (NT) or incubated at 30°C in the presence of phosphatase (IPP) with (+) or without (-) phosphatase inhibitors for 60 min and were analyzed by Western blot. (D) Western blot of 293T cell lysates that have been treated as followed: heat shock at 42°C for the indicated times; H₂O₂ (500 mM, 4 h); arsenite (200 mM, 4 h); rapamycin (200 nM, 4 h); nocodazole (400 ng/ml, 16 h), with (+) or without (-) inhibitors of lysosomal proteases (E64d, 10 μg/ml; pepstatin, 10 μg/ml). (E) HeLa-BAG3-GFP cells were

imaged by time-lapse fluorescence microscopy; arrowheads designate the centrosomes and surrounding perinuclear material. (F) Confocal images of mitotic HeLa-BAG3-GFP cells synchronized by a 24 h-Thymidine block and released in fresh medium for 8 h, showing staining of α -tubulin and g-tubulin. (G) Confocal images of mitotic HeLa cells showing staining of α -tubulin and endogenous BAG3 with polyclonal anti-BAG3 antibodies (LP9, LP11); Bars, 10 μ m. (H) Westerns blots of centrosomal fractions purified from asynchronous (AS) or from mitotic (M) HeLa cells synchronized with nocodazole; centrosomal markers: CEP170, g-tubulin; calreticulin and HSPB5: negative controls; Total: proteins levels in total cell extracts.

doi:10.1371/journal.pgen.1005582.g001

increase in the time spent in mitosis (Fig 2C). While BAG3-depleted cells eventually progressed through anaphase, the incidence of nuclear abnormalities resulting from aberrant mitosis and cytokinesis (i.e. micronucleation and multinucleation) was substantially increased (Fig 2D). Micronucleated and multinucleated cells often result from chromosomes that have not been properly captured and lag behind during anaphase forming an anaphase bridge (Fig 2D, arrowheads) [32]. Similar nuclear abnormalities were also observed in MCF7 cells transfected with BAG3-specific siRNAs, indicating that the effects of BAG3 on cell division are not cell type-specific (S1B and S1C Fig).

We further characterized the mitotic delay caused by depletion of BAG3 by scoring cells at different stages of mitosis after staining of kinetochores (CREST staining) and spindle microtubules (α -tubulin staining) (S6 Fig). There was a significant increase in the proportion of BAG3-depleted cells at prometaphase, or at metaphase with unaligned chromosomes at the spindle poles (Fig 2E and 2F, arrowheads). Immunofluorescence using anti-mitotic arrest-deficient gene 2 (MAD2) antibody showed that this essential spindle checkpoint (SAC) protein was present at unaligned kinetochores in BAG3-depleted cells (Fig 2G) [33]. Together with the mitotic delay observed, these results suggest that BAG3 depletion does not perturb the function of the SAC.

BAG3 depletion impairs the three-dimensional positioning of the spindle

To further define the effect of BAG3 depletion on the process of chromosome congression to the metaphase plate in live cells, we imaged siRNA-treated HeLa-GFP-H2B cells that have been synchronized in mitosis, by spinning disk confocal microscopy. Live-cell imaging in HeLa-GFP-H2B recapitulated the mitotic delay observed in Fig 2B and demonstrated that this delay is associated with two main phenotypes (Fig 3A, siBAG3): 1- Some BAG3-depleted cells were attempting to align chromosomes that remained localized at spindle poles for prolonged period of time (>60 min), before finally progressing through anaphase (Fig 3A, second row of panels); 2- Others appeared to be stalled at the prometaphase stage (>60–90 min) with chromosomes dispersed in different focal planes (Fig 3A, third row of panels). Thus live cell imaging data were consistent with a delay in satisfying the spindle assembly checkpoint caused by chromosome congression defects upon reduction of BAG3 levels.

We reasoned that improper alignments of chromosomes that often looked like donuts in BAG3 depleted cells at the metaphase stage (Fig 3, “350 min” in second row) could result in part from incorrect positioning of the mitotic spindle, which is normally oriented parallel to the surface of the coverslip in nonpolarized cells [34]. To then analyze the effect of BAG3 depletion on mitotic spindle behavior, we imaged siRNA-transfected HeLa cells stably expressing red fluorescent protein (RFP)-H2B after having delivered in these cells low, non-interfering levels of RFP- α -tubulin and GFP-actin. Cells that have been transfected with control siRNAs rapidly aligned their mitotic spindle parallel to the substrate (Fig 3B, siCtl; S1 Movie). In marked contrast, time-lapse sequences revealed that mitotic spindles were unusually motile and incorrectly positioned within cells upon depletion of BAG3 (Fig 3B, siBAG3; S2 and S3 Movies). In a significant proportion of BAG3-depleted cells (~52.8%), spindles frequently

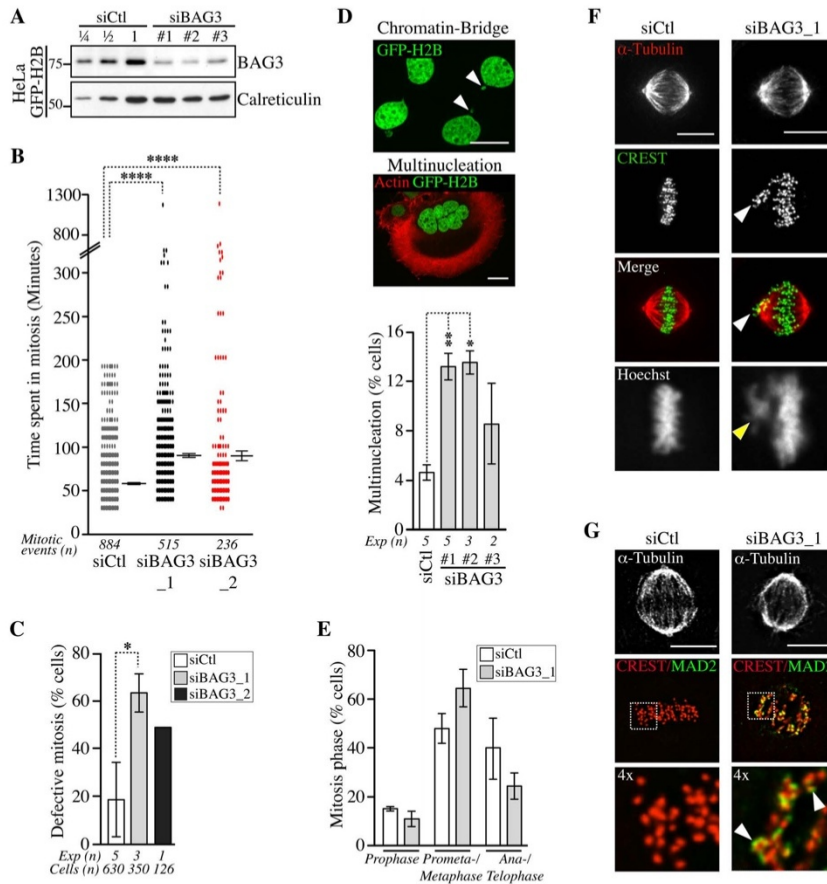


Fig 2. Depletion of BAG3 delays cells in mitosis and impairs chromosome segregation. (A) Representative Western blots of extracts of HeLa-GFP-H2B cells showing BAG3 depletion levels after transfection with different BAG3-specific siRNAs as indicated. Depletion was estimated at > 75% by loading increasing amounts of control extracts (siCtrl); calreticulin levels: loading control. (B) Graph depicting the time spent in mitosis determined from time-lapse imaging of unsynchronized HeLa-GFP-H2B cells transfected with the indicated siRNAs. The means +/- SE are from 884 or 515 mitotic events from 4 or 3 independent experiments (siCtrl, siBAG3_1, respectively), or from 236 mitotic events from 1 representative experiment (siBAG3_2) (S1 Dataset). (C) Graph showing the percentages of HeLa-GFP-H2B cells treated and imaged as in B, which exhibited typical mitotic defects: delay in prometaphase-metaphase, chromosome misalignment and multipolar spindle; means +/- SD calculated from individual cells (n) from independent experiments (Exp). (B, C) Mann-Whitney's tests were performed relative to control, ****, p < 0.0001, *, p < 0.05. (D) Confocal images of HeLa-GFP-H2B cells transfected with BAG3-specific siRNAs, showing chromatin bridge (white arrowheads) or multinucleation; green: GFP-H2B; red: F-actin staining; Bars, 20 μm. The graph shows the incidence of multinucleation, which was estimated 72 h after transfection from 2 to 5 independent experiments as indicated; n > 650 cells; **, p < 0.01; *, p < 0.05 (Mann-Whitney test). (E-G) siRNA-treated HeLa-GFP-H2B cells were synchronized in mitosis by the double Thymidine block method and processed for staining of kinetochores (CREST staining), spindle microtubules (α-tubulin staining) and SAC protein (MAD2 staining). The graph depicts percentages of cells at different stages of mitosis; means +/- SD from > 500 cells from 3 independent experiments. ****, p < 0.0001, compare siBAG3 to siCtrl (prometaphase-metaphase cells) by the Exact Fisher Test. Confocal image stacks show BAG3-depleted cells with characteristic unaligned kinetochores (arrowheads in F) and strong MAD2 staining emphasized in enlarged views of the boxed regions (arrowheads in G); Bars, 10 μm.

doi:10.1371/journal.pgen.1005582.g002

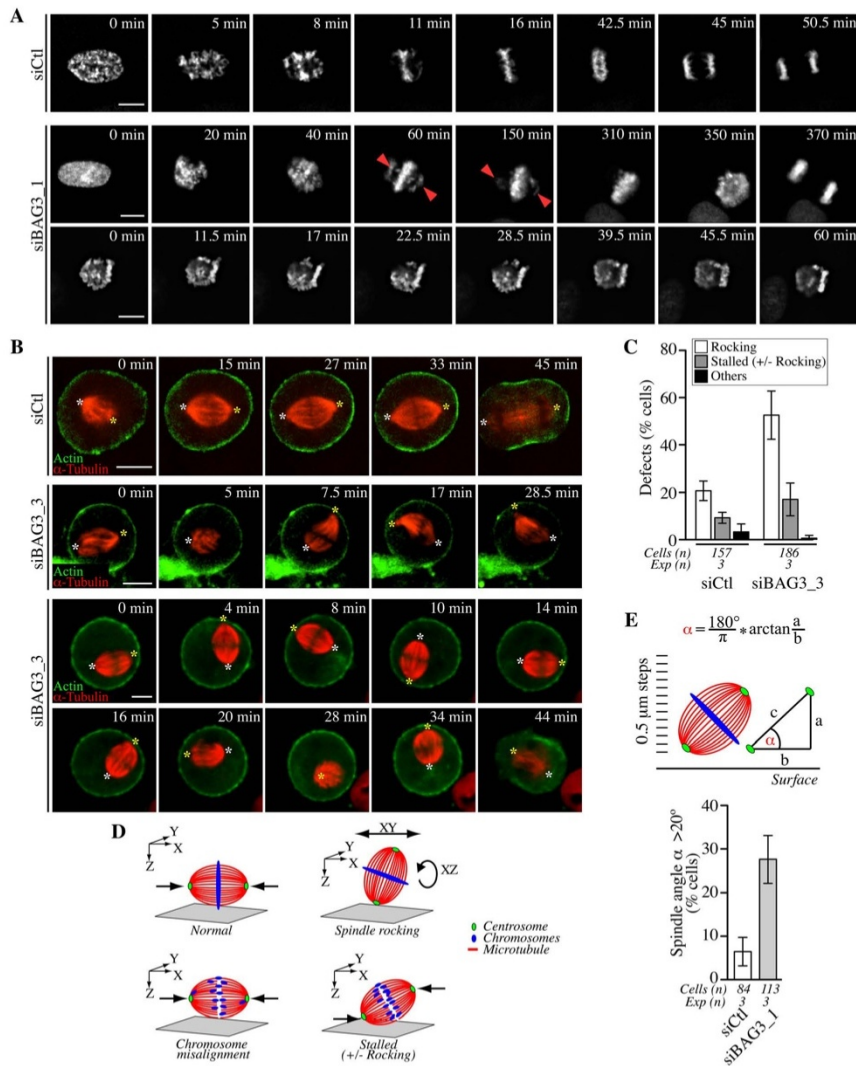


Fig 3. Bag3 regulates chromosome congression and spindle orientation. (A) Deconvolved time-lapse sequences of siRNA-treated HeLa-GFP-H2B cells; siCtl: control siRNA; siBAG3_1: BAG3-specific siRNA; arrowheads designate unaligned chromosomes remaining at spindle poles for prolonged periods. (B) Confocal time-lapse sequences of siRNA-treated HeLa-RFP-H2B expressing low, non-interfering levels of RFP-a-tubulin and GFP-actin. Cells were synchronized by the double Thymidine block method and were imaged for a 1 h-period at ~1.5 min intervals. Asterisks designate spindle poles that remained stable from prometaphase to anaphase onset in control cells (siCtl; S1 Movie), but displayed abnormal movements in BAG3-depleted cells (siBAG3_3; S2 and S3 Movies). (C) Quantification of cells treated as in A, depicting abnormal spindle dynamics: rocking, large movements in the xy plane

and/or rotations in the z -axis; stalled +/- rocking, arrested in prometaphase or metaphase for > 30 min; means +/- SD from >150 cells from 3 independent experiments (S1 Dataset). (D) Schematic of the mitotic phenotypes associated with BAG3 depletion; green: centrosomes; red: spindle microtubules; blue: chromosomes. (E) Scheme of the method used to measure the spindle angle α in fixed cells. siRNAs-treated HeLa-GFP-H2B cells were synchronized by the double Thymidine block method and processed for IF with anti- α -tubulin, anti- g -tubulin and Hoechst. The graph shows percentages of cells that exhibited a spindle angle $\alpha > 20^\circ$; means +/- SE from >84 cells from 3 independent experiments; **, $p = 0.0072$, compare siBAG3 to siCtl by the Exact Fisher Test.

doi:10.1371/journal.pgen.1005582.g003

rotated in the z -axis and showed large movements in the xy plane, while aberrant spindle rocking was observed in only ~20% of cells transfected with control siRNAs (Fig 3C and 3D).

To quantify the spindle mispositioning defects, we measured the spindle angle α relative to the surface of the coverslip in fixed cells. HeLa-GFP-H2B cells were transfected with siRNAs and stained with anti- α -tubulin and anti- g -tubulin after cell synchronization. In control cells at metaphase, the average spindle angle was $\sim 8.3^\circ \pm 0.6$, in agreement with previous work [35, 36]. A marginal, but significant increase in the average spindle angle was measured in cells at metaphase upon depletion of BAG3 ($\sim 12.6^\circ \pm 0.8$). Under these conditions, however, there was a remarkable 4-fold increase in the proportion of BAG3-depleted cells ($\sim 27.7\% \pm 9.5$) relative to control cells ($\sim 6.6\% \pm 5.6$) showing a spindle angle of $> 20^\circ$ more typical of cells at the prometaphase stage that have not completed alignment (Fig 3E) [36]. These data confirmed that a significant proportion of BAG3-depleted cells underwent z -axis spindle rotations, which could delay chromosome congression and anaphase onset. Indeed, there was higher proportion of BAG3-depleted cells showing mitotic delays (>30 min in prometaphase-metaphase) along with spindle rocking in time-lapse analyses (Fig 3C).

The effect of BAG3 on mitotic spindle dynamics involves its chaperone partner HSPB8, but not HSP70/HSC70

We next sought to determine the dependence of the mitotic function of BAG3 for its associated molecular chaperones and for its PXXP motif, which connects BAG3 to signaling factors [37]. To do so, we developed a protocol to perform depletion-rescue experiments. Structural requirements on BAG3 for restoration of normal spindle dynamics were investigated by using BAG3-GFP fusion proteins bearing mutations that abolish binding to HSPB8 (IPV) [38], deletion of the HSP70/HSC70-binding domain (Δ BAG) or deletion of the PXXP motif (Δ PXXP) (Fig 4A) [39, 40]. Recombinant adenoviruses were used to express the fusion proteins, which were appropriately localized within cells and exhibited the expected behaviors in terms of binding to HSPB8 and HSP70/HSC70 (Fig 4B and S2 Fig). Using siRNA duplex targeting the 3' untranslated region of BAG3 and the experimental scheme depicted in Fig 4C, we achieved efficient knockdown of endogenous BAG3. Individual BAG3-GFP proteins were introduced at near physiological levels in BAG3-depleted cells (Fig 4C) together with RFP- α -tubulin to determine their functional impact on spindle dynamics in single cells. Under these conditions, expression of wild type (WT) BAG3-GFP in BAG3-depleted cells, but not of GFP, could restore to near normal the progression through early mitosis, bringing the level of phenotypic defects in line with control cells ($\sim 37\%$ compared to $\sim 32\%$; Fig 4E and 4F; S4 and S5 Movies). It also corrected the decrease seen in HSPB8 protein levels upon depletion of BAG3, consistent with our previous findings that BAG3 and HSPB8 form a stoichiometric complex that is destabilized upon reduction of BAG3 levels (Fig 4C, compare GFP to WT) [15]. In marked contrast, BAG3 (IPV) could not efficiently restore HSPB8 levels nor correct the mitotic defects in BAG3-depleted cells, despite binding to HSP70/HSC70 (Fig 4B). This was reflected by a persistence of characteristic mitotic defects (delays in metaphase with spindle rocking) in a significant proportion of BAG3-depleted cells expressing BAG3 (IPV) (Fig 4E and 4F; S6 Movie). Likewise, BAG3 (Δ PXXP) was unable to correct the BAG3-dependent mitotic phenotype (Fig 4F),

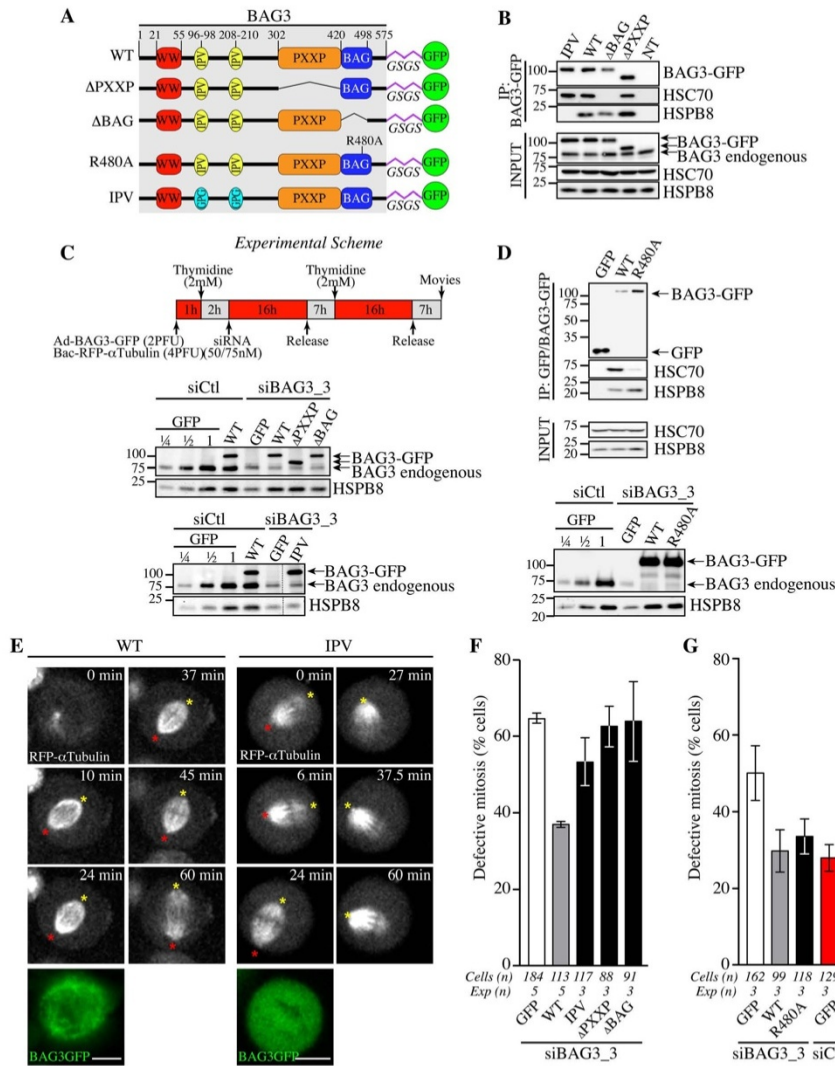


Fig 4. Structural requirements on BAG3 for restoration of normal spindle dynamics in BAG3-depleted cells. (A) Schematic of BAG3-GFP proteins bearing mutations or deletions of functional domains and a glycine/serine-rich flexible linker peptide (GSGS) that distances the GFP moiety from the rest of the BAG3, as reported in [75]; WT, wild type. (B, D) BAG3-GFP and GFP IPs were prepared from HeLa cells infected with recombinant adenoviruses driving expression of BAG3-GFP or GFP proteins (Ad-BAG3-GFP or Ad-GFP) using anti-GFP, and analyzed by Western blot; levels of endogenous BAG3, HSC70 and HSPB8 in total cell extracts are shown (Input). (C) Schematic of the protocol developed to achieve knockdown-rescue experiments using siBAG3_3, Ad-BAG3-GFP and BacMam-RFP- α -tubulin. Total cell extracts were prepared 46 h after transfection during the 2nd release and analyzed by Western blot with

anti-BAG3 and anti-HSPB8 antibodies. Please note that individual BAG3-GFP proteins were introduced at near the endogenous level of BAG3 and could restore HSPB8 levels in BAG3-depleted cells, except for BAG3 (IPV) unable to bind to HSPB8. (E) Representative confocal time-lapse sequences of RFP- α -tubulin in cells from C, showing restoration of spindle dynamics upon introduction of WT BAG3-GFP, but not of BAG3-GFP (IPV) in BAG3-depleted cells; red and yellow asterisks designate the position of spindle poles (S5 and S6 Movies); Bars, 10 μ m. Mitotic cells were imaged by spinning disk confocal microscopy for 60 to 90 min at ~1.5 min intervals. Please refer to S4–S8 Movies for samples of the phenotypes observed. (F, G) Quantification of cells from C, indicating percentages of cells with abnormal mitosis defined as spindle rocking, stalled in mitosis +/- spindle rocking, or chromosome misalignment; means +/- SE from 88 to 184 cells from 3 to 5 independent experiments as indicated (S1 Dataset). Statistical significance was analyzed with the Exact Fisher Test; (F) siBAG3_3 + WT versus siBAG3_3 + GFP: ****, $p < 0.0001$; siBAG3_3 + WT versus siBAG3_3 + IPV: **, $p = 0.001$; siBAG3_3 + WT versus siBAG3_3 + Δ PXXP: ***, $p = 0.0003$; siBAG3_3 + WT versus siBAG3_3 + Δ BAG: ***, $p = 0.003$; (G) siBAG3_3 + WT versus siBAG3_3 + GFP: *, $p = 0.005$; siBAG3_3 + WT versus siBAG3_3 + R480A: ns, $p = 0.884$; siBAG3_3 + WT versus siCil + GFP: ns, $p = 0.46$.

doi:10.1371/journal.pgen.1005582.g004

despite binding to HSPB8 and restoring its protein levels (Fig 4B and 4C). This suggests that interactions with HSPB8 and other proteins through the PXXP motif are required to mediate the effect of BAG3 on mitotic spindle positioning.

Expression of BAG3 (Δ BAG) also could not restore normal spindle dynamics (Fig 4E). However, the BAG domain might regulate BAG3 interactions with proteins other than HSP70/HSC70 [39, 41, 42]. To more specifically ascertain the contribution of HSP70/HSC70, we introduced a point mutation in the BAG domain of BAG3 (R480A) that disrupts its association with HSP70/HSC70 but not its binding to SH3-containing proteins (Fig 4D, upper panel) [43]. Surprisingly, BAG3 (R480A) expression significantly reduced the characteristic mitotic defects in cells treated with BAG3-specific siRNAs (Fig 4D, lower panel, and Fig 4G and S7 Movie). In contrast, this mutant BAG3 (R480A) failed to restore aggresome-targeting of ubiquitinated proteins aggregates (S3 Fig). Thus the data suggest that the mitotic effects of BAG3 mostly rely on its association with HSPB8 and that binding to HSP70/HSC70 is dispensable.

To further confirm a role for HSPB8, analyses of spindle dynamics were performed after treating HeLa cells with HSPB8-specific siRNAs that achieved ~75% depletion of HSPB8 in these cells (Fig 5A). In agreement with a role as a mitotic partner of BAG3, depletion of HSPB8 delayed mitotic progression (S4A Fig). Time-lapse imaging showed dramatic spindle movements in the xy plane and z-axis rotations in cells treated with different HSPB8-specific siRNAs, together with defects in mitotic spindle positioning that mimicked the BAG3-dependent mitotic phenotype (Fig 5B and 5C; S9, S10 and S11 Movies). Remarkably, HSPB8-RFP, unlike RFP, showed robust recruitment to centrosomes and the surrounding perinuclear material in cells arrested at the G2/M border by treatment with the specific cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) inhibitor RO-3306 (Fig 5F, red arrows, and S4C Fig) [44]. In agreement with BAG3 translocation to the centrosomal region before nuclear envelope breakdown during an unperturbed mitosis (Fig 1E), both HSPB8 and hypophosphorylated BAG3 were confined to a spherical perinuclear space in G2-arrested cells (Fig 5D and 5E). However, BAG3 (IPV) like wild type BAG3-GFP in cells depleted of HSPB8 remained more diffuse in the perinuclear space of G2-arrested cells (Fig 5G, black arrow). In addition, HSPB8 depletion reduced BAG3 supershift in mitotic cells (Fig 5H, siHSPB8, and S4D Fig, IPV). Thus HSPB8 appeared to facilitate BAG3 translocation to a centromal-perinuclear region before nuclear envelope breakdown and its subsequent phosphorylation at mitotic entry, suggesting that both events are related. Based on the results, we conclude that the effect of BAG3 on mitotic spindle orientation requires its interaction with HSPB8 and some signaling function of the PXXP motif, but not binding to HSP70/HSC70.

Silencing of the autophagy cargo receptor p62/SQSTM1 mimics the effect of BAG3 and HSPB8 depletion on mitotic spindle dynamics

We then examined a potential connection between the mitotic function of BAG3 and BAG3--mediated selective autophagy pathway, which involves its association with p62/sequestosome-

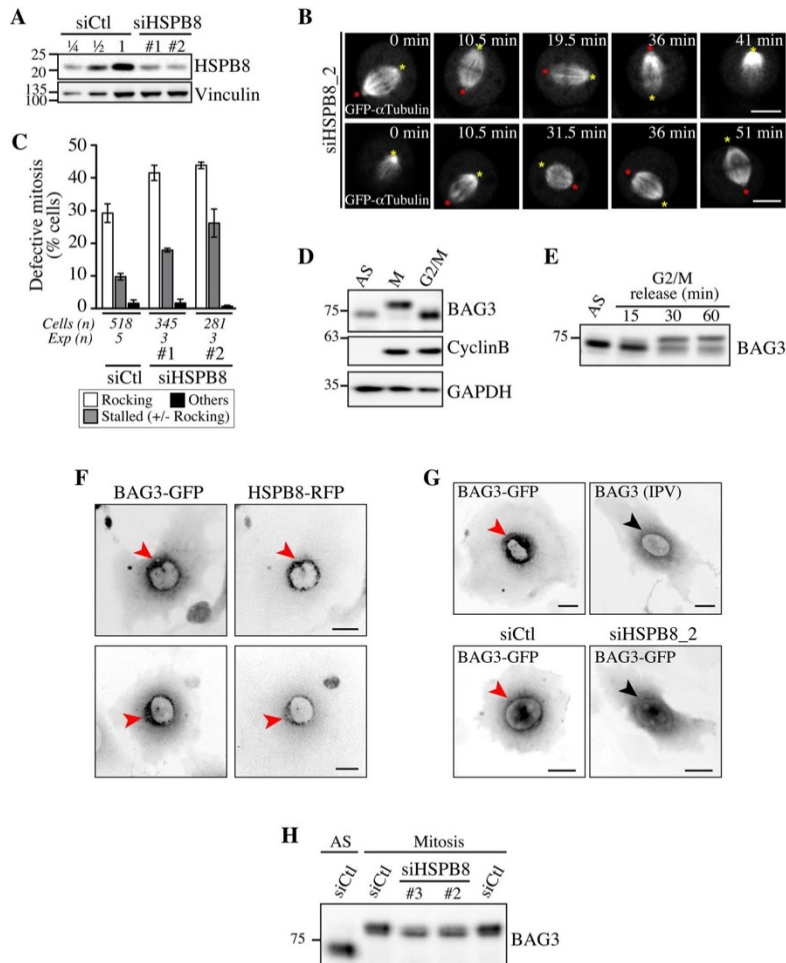


Fig 5. Defects in spindle dynamics upon depletion of HSPB8 correlate with impaired localization of BAG3 at G2/M. (A) Representative Western blots of total cell extracts prepared from HeLa-RFP-H2B transfected with control siRNA (siCtl) or HSPB8-specific siRNAs (siHSPB8 #1 and #2), showing reduction of HSPB8 levels of ~75%; vinculin levels: loading controls. (B) Confocal time-lapse sequences from HeLa-RFP-H2B cells transfected with siHSPB8_2 and transfected with BacMam-GFP- α -tubulin, which show aberrant spindle rocking; colored asterisks designate spindle poles. Cells were synchronized by the double Thymidine block method and imaged by spinning disk confocal microscopy for 60 min at ~1.5 min intervals; Bars, 10 μ m. (C) Quantification of cells from B, indicating abnormal mitosis defined as spindle rocking, stalled in mitosis +/- spindle rocking, or others (chromosome misalignment or multipolar spindle); means +/- SE from at least 281 cells from at least 3 independent experiments, as indicated (S1 Dataset). (D-E) Western blots of extracts prepared from asynchronous HeLa-RFP-H2B cells (AS), arrested in mitosis by a nocodazole-block (100 ng/ml, 16 h), or arrested at the G2/M border by a Thymidine/RO-3306-block (8 μ M RO-3306, 18 h), showing hypophosphorylated BAG3 (AS, G2/M), hyperphosphorylated BAG3 (M), and cyclin B1. (E) RO-3306-treated cells that have been released in fresh medium show BAG3 supershifted band as cells exited the G2-block; AS: asynchronous. GAPDH levels: loading controls. (F, G) Deconvolved image stacks of G2-arrested HeLa cells transfected with Ad-BAG3-GFP and Ad-HSPB8-RFP, showing robust enrichment of BAG3-HSPB8 to centrosomes and the surrounding perinuclear material (red arrows). Please note that mutation of HSPB-binding domains (BAG3 IPV) like

depletion of HSPB8 (siHSPB8) markedly impaired recruitment of BAG3-GFP to a defined perinuclear space at G2/M (black arrows). (H) Western blots of total extracts prepared from siRNA-treated HeLa cells arrested at prometaphase by treatment with nocodazole (100 ng/ml, 16 h), showing partial supershift of BAG3 in cells depleted of HSPB8; AS: asynchronous cells.

doi:10.1371/journal.pgen.1005582.g005

1 (SQSTM1) (hereafter named p62) [16, 23, 45]. P62 is considered to act as a receptor for ubiquitinated proteins to sequester misfolded protein aggregates in cytoplasmic inclusions and promote their autophagic clearance by interacting with the forming autophagosome [46–49]. Intriguingly, it has been found that p62 is specifically phosphorylated at mitotic entry and regulates anaphase onset [50]. Hence we assessed the impact of p62-specific siRNAs on mitotic spindle dynamics. Remarkably, depletion of p62 mimicked the phenotypic defects seen upon reducing BAG3 or HSPB8 levels, delaying cells at prometaphase-metaphase and causing dramatic spindle rocking (Fig 6A, 6B and 6C and S4B Fig; S12 and S13 Movies). While the mitotic delay observed here upon p62 depletion is consistent with previous work, this is the first report of an effect of p62 on spindle orientation.

To further investigate a functional connection between BAG3, HSPB8 and p62 in mitotic cells, we performed coimmunoprecipitation analyses in HeLa cells growing asynchronously (AS), or synchronized in mitosis with nocodazole (M). As expected, the hyperphosphorylated form of BAG3 was associated with HSPB8 in mitotic cell extracts (Fig 6D and 6E). Furthermore, its associations with p62 and histone deacetylase 6 (HDAC6), a p62 partner in the aggregate-autophagy pathways [51], were clearly enhanced (Fig 6D). No significant increase in HSP70/HSC70 was detected in mitotic BAG3 complexes, in agreement with an HSP70/HSC70-independent function for BAG3 in mitosis. In contrast, the BAG3 complexes isolated from cells submitted to proteasomal stress contained higher levels of HSP70 (Fig 6E). Together, these findings provide strong support for the existence of mitotic-specific BAG3 complexes comprising HSPB8 and p62 but not HSP70/HSC70 that would facilitate the accurate positioning of the mitotic spindle in HeLa cells.

Knockdown of BAG3, HSPB8, or p62 impaired actin-based remodeling of mitotic cells and assembly of adhesion landmarks that regulate spindle orientation

Given that the BAG3-HSPB8 chaperone complex manages, together with p62, the remodeling of the actin-based cytoskeleton during mechanical stress [52], we hypothesized that their function in mitosis may similarly be related to the remodeling of actin-based structures. Spindle alignment depends on interactions between the spindle and the mitotic actin-based cytoskeleton, which undergoes extensive remodeling at mitotic entry to allow for changes in cell-shape [53, 54]. These changes critically rely on the construction of a mechanically rigid actin cortex and the remodeling of mechanosensitive cell-substrate adhesions, for supporting the polarized distribution of force generator complexes to control interactions with astral microtubules [31, 55]. Because cells experience profound changes in cell tension homeostasis at mitotic entry, we reasoned that the chaperone complex could contribute to the “fitness” of actin-based structures that control spindle positioning.

To test this idea, we first inspected the morphology of siRNA-treated HeLa cells synchronized in early mitosis. At onset of mitosis, cells retract and round up upon extensive remodeling of the actin-based cytoskeleton, leaving thin actin cables attached to the substrate called retraction fibers. The actin-rich retraction fibers are believed to act as guides to orient the spindle parallel to the adhesive substrate in tissue culture cells, by enabling cells to read changes in the mechanics of matrix to which they are attached and by providing polarity cues [34, 56]. Analysis of fixed cells stained with phalloidin (F-actin), anti- α -tubulin (spindle microtubules)

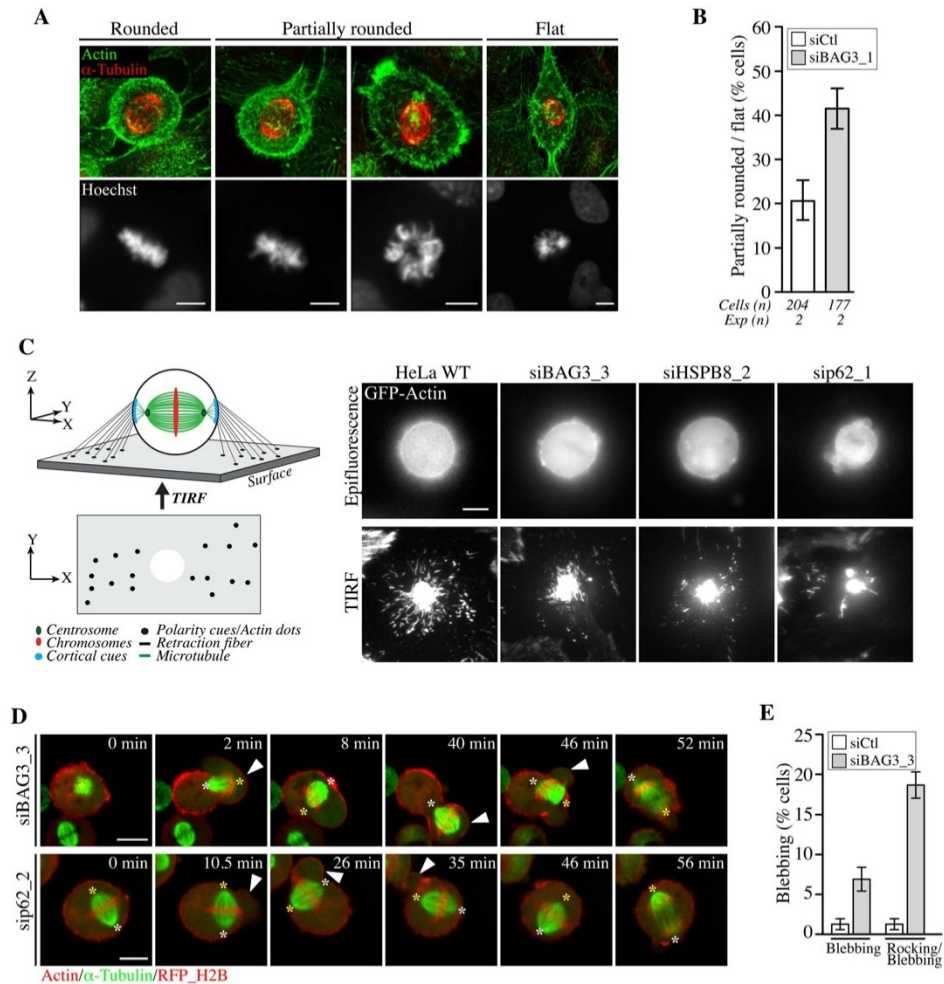


Fig 7. BAG3, HSPB8 and p62 regulate remodeling of mitotic F-actin structures. (A) HeLa cells transfected with control siRNA or with BAG3-specific siRNA (siBAG3_1) were synchronized by the double Thymidine block method and processed for IF with anti- α -tubulin, phalloidin (F-actin) and Hoechst (DNA). Deconvolved confocal image stacks show F-actin and chromosomes in rounded mitotic cells compared to partially rounded and flat mitotic cells; Bars, 10 μ m (B) Quantification of cells from A, indicating the proportion of siRNA-treated cells with defects in mitotic cell rounding; means \pm SD from 2 independent experiments. (C) Schemes depicting the proposed organization of retraction fibers in x, y, z view, with the deduced x, y view by TIRFM of actin dots connecting the mitotic cortex to the adhesive substrate. Representative TIRFM images from HeLa cells at metaphase transfected with the indicated siRNAs and transduced with BacMam-GFP-actin, showing a bright actin cortex sitting on the adhesive substrate surrounded by numerous actin dots in control cells, which are disorganized upon depletion of BAG3, HSPB8 or p62; the corresponding epifluorescence images are shown. Cells were imaged 48 h after transfection of siRNAs. (D) Confocal time-lapse sequences of HeLa-RFP-H2B cells at metaphase that have been transfected with siBAG3_3 or sip62_1 and transduced with BacMam-GFP- α -tubulin and BacMam-RFP-actin, showing abnormal blebbing of the mitotic cortex designated by arrowheads which is associated with displacements of the spindle (S14, S15 and S16 Movies); asterisks designate spindle poles; Bars, 10 μ m. (E) Quantification of cells from D,

indicating the proportion of cells undergoing blebbing alone or blebbing with spindle rocking; means \pm SE from 158 (siCtl) or 195 cells (siBAG3) from 3 independent experiments (S1 Dataset).

doi:10.1371/journal.pgen.1005582.g007

retraction fibers connect the mitotic cortex to the adhesive surface in live cells expressing GFP-actin (Fig 7C). Control cells at metaphase exhibited numerous actin dots that were distributed around the ventral cell cortex marked by a dense core of actin. These actin dots were presumed to represent the extremities of retraction fibers linking the mitotic cortex to the adhesive substrate, as they are described as membrane tubes filled with actin filaments (Fig 7C, scheme; HeLa WT) [59]. When BAG3, HSPB8, or p62 were silenced, there was a marked disorganization of the actin dots surrounding the ventral cortex of round, mitotic cells (Fig 7C, siBAG3; siHSPB8; sip62). The actin dots now appeared reduced in numbers and/or dispersed in small clusters instead of showing a circumferential distribution. Examination of retraction fibers by confocal microscopy in mitotic cells expressing LifeAct-GFP—a probe that binds to F-actin, confirmed a marked decrease in retraction fibers surrounding the mitotic cortex of BAG3-depleted cells (S5D Fig). In agreement with a specific role for BAG3, depletion of BAG1 or BAG2—two other BAG proteins devoid of HSPB8-binding motif [15], did not similarly affect retraction fiber distribution (S5A, S5C and S5D Fig). Moreover, unlike BAG3 neither BAG1 nor BAG2 showed detectable supershifted band in mitotic cell extracts (S5B Fig). Thus the data strongly suggest that mitotic rounding, the process by which retraction fibers are formed, is specifically impaired upon reduction of BAG3, HSPB8 or p62 levels.

We further observed that depletion of BAG3 or p62 enhanced membrane blebbing and cell-shape deformations in prometaphase-metaphase cells, arguing for deregulation of cortical tension even in the absence of spindle phenotype (Fig 7D and 7E). Remarkably, in cells showing severe phenotypes, spindles were seen erratically rocking or pushed toward blebs of unusually large size (Fig 7D, time-sequences; S14, S15 and S16 Movies). Such phenotypes were reminiscent of mitotic defects caused by disrupting cortical cues/anchors directing stable spindle positioning.

Stiffening of the mitotic cortex can correct spindle dynamics defects caused by depletion of BAG3

Cortical stiffening is associated with cell rounding at mitotic entry and is thought to help stabilize cortical cues and the mitotic spindle. Hence the phenotypes observed upon depletion of BAG3, HSPB8 or p62 could be due, at least in part, to defects in establishing a mechanically rigid actin cortex. To obtain evidence for causal relationship, we incubated siRNA-treated cells synchronized in mitosis in medium containing the tetravalent lectin concanavalin A for a short period of time (Fig 8A and 8B). Concanavalin A extensively crosslinks glycoproteins from the plasma membrane and is often used to increase stiffness of the cortex from the outside [58, 60, 61]. Significantly, this treatment stabilized spindle positioning in BAG3-depleted cells and led to a 2.5-fold reduction in the number of cells at metaphase showing defects in spindle positioning upon depletion of BAG3, bringing it in line with cells transfected with control siRNAs (Fig 8C and 8D). Collectively, our results suggest that defects in spindle orientation are functionally related to an inability to establish a rigid mitotic cell cortex and to generate the appropriate tensile forces.

Discussion

BAG3 and HSPB8 form a stoichiometric complex that has been linked to protein quality control. In this study, we present evidence for a novel role for the BAG3-HSPB8 complex in

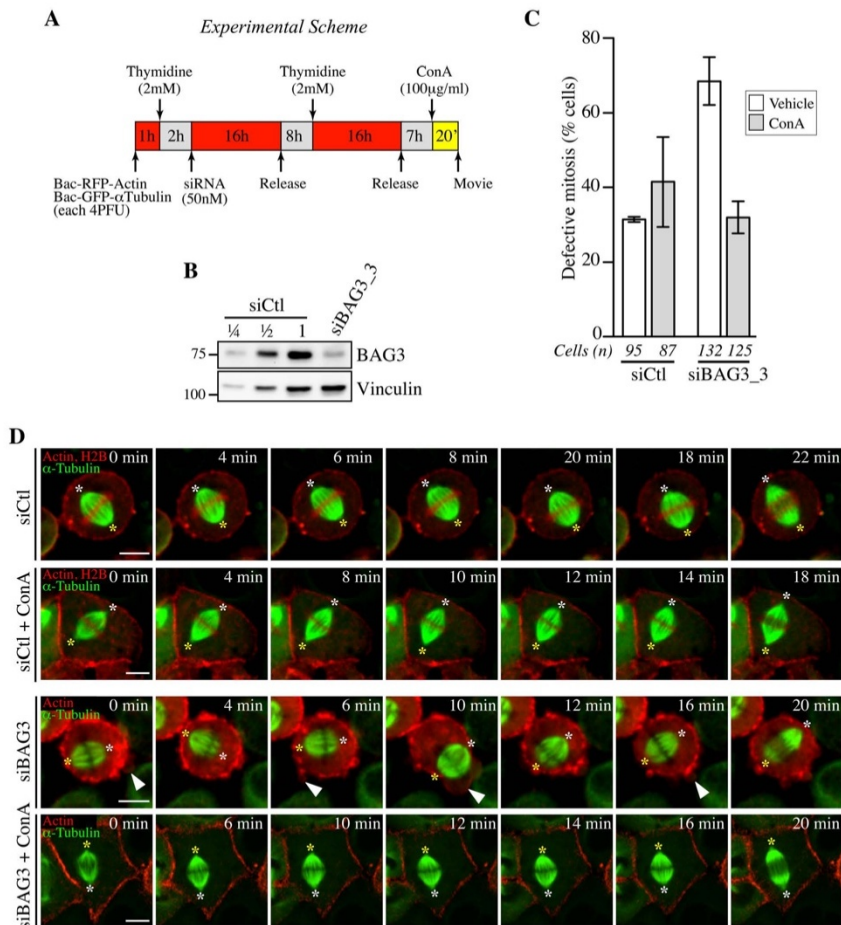


Fig 8. Concanavilin A restores normal spindle dynamics in BAG3-depleted cells. (A) Experimental scheme. (B) Western blot of total cells extracts prepared from HeLa-RFP-H2B cells transfected with control siRNA (siCtl) or siBAG3_3 and processed as depicted in A. (C) Quantification of the proportion of siRNA-treated cells that exhibited abnormal mitosis after a 20-min incubation period with ConA (100 μ g/ml) or the vehicle, defined as spindle rocking, mitotic arrest +/- rocking, cortex blebbing and/or chromosome misalignment; means +/- SD from at least 87 cells from 2 independent experiments (S1 Dataset). Cells were imaged by spinning confocal microscopy for 60 min at ~ 2 min intervals. (D) Representative confocal time-lapse sequences from HeLa-RFP-H2B cells from C, showing that characteristic spindle rocking associated cortical blebbing is inhibited upon addition of ConA; please note that concanavilin A impaired mitotic cell rounding in both control HeLa-RFP-H2B cells transfected with siCtl and in siBAG3-treated cells, as reported before [58]. Arrowheads designate cortex blebbing in siBAG3-treated cells incubated with the vehicle only; asterisks designate spindle poles; Bar, 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pgen.1005582.g008

remodeling of the actin-based cytoskeleton at mitotic entry, which involves possible interactions with signaling proteins through BAG3 PXXP motif and is mimicked by the autophagy receptor p62. The exact mechanism whereby BAG3-HSPB8 can regulate mitotic cell remodeling remains to be defined at the molecular level. Because the same mitotic phenotype is recapitulated by depleting any protein in the BAG3-HSPB8-p62 axis, we suggest that they act within a so-far unrecognized chaperone-mediated quality control mechanism to assist in the proper and timely assembly of a rigid actin cortex that is proposed to maintain high mechanical stress throughout metaphase to guide spindle orientation. To our knowledge, this is the first report of a role for BAG3-HSPB8 in the normal operation of dividing cells, one for which HSP70/HSC70 would be dispensable.

Our finding that BAG3-HSPB8 regulates mitotic cell rounding and the integrity of mechanically sensitive actin-rich retraction fibers is in line with the reported role of BAG3-HSPB8 as a component of a multichaperone complex that regulates a selective form of autophagy called chaperone-assisted selective autophagy (CASA). CASA has been described as a tension-induced autophagy pathway for removal and degradation of large cytoskeleton components damaged during contraction in muscle cells to promote stability of F-actin-based structures [62]. In this paradigm, HSPB8 is proposed to be required for efficient recognition of the actin-crosslinking protein filamin C, which becomes mechanically unfolded [52]. HSC70 would mediate processing of substrate proteins by recruiting an E3 ubiquitin ligase, providing a signal for the autophagic receptor p62. Even though mitosis and muscle contraction are completely unrelated cellular processes, they share a requirement for maintaining the integrity of actin-based structures under high tension. It has been shown by Fink et al. that the mitotic actin cortex is a unique structure that combines mechanosensitivity with robustness to protect the process of spindle formation from external perturbations [56]. The results presented here suggest that changes in tension homeostasis at mitotic entry could engage a specialized BAG3-HSPB8 chaperone activity to assist in the construction of a mechanically robust actin cortex and of functional retraction fibers, which are crucial to orient centrosomes and mediate proper spindle positioning. Recruitment of the BAG3-HSPB8 complex to centrosomes and the surrounding perinuclear material at the G2/M border is consistent with such a role.

Despite some similarities with the CASA process, we demonstrate that the activity of BAG3-HSPB8 in early mitosis is uncoupled from the HSP70/HSC70 chaperone system, suggesting a different mode of action and reinforcing the notion that not all HSPBs cellular activities would require a functional HSP70/HSC70 chaperone machine [11, 63]. Indeed, the mutant BAG3 (R480A) that cannot bind to HSP70/HSC70 was able to rescue the mitotic activity of BAG3 on spindle dynamics; this mutant was however defective in the aggresome-autophagy pathway, as expected. In contrast, a mutant BAG3 bearing large deletion of the BAG domain was defective in our model, which might reflect additional partners for the BAG domain as suggested before [39]. BAG3 is specifically hyperphosphorylated at mitotic entry, just like p62 [50], suggesting that phosphorylation could favor mitotic-specific protein interactions. In agreement, associations between BAG3, HSPB8, p62 and HDAC6 were promoted in mitotic cells, while BAG3 association with HSP70/HSC70 was more abundant under conditions of proteasomal failure. Thus a specialized chaperone complex comprising BAG3-HSPB8-p62 (but not HSP70) may be activated by cell cycle-regulated kinases to facilitate the detection and sequestration of cytoskeletal/signaling components that need to be removed for timely remodeling of mitotic actin-based structures. While the ATP-independent holdase function of the HSPB family is thought to sequester damaged proteins to prevent further aggregation during proteotoxic stress, it appears also to be exploited under normal conditions as a reversible mechanism to sequester proteins [8, 9]. For instance, HSPB1 would sequester actin monomers under resting conditions and serve as a “reservoir” of actin, which would be released upon agonist-induced phosphorylation of HSPB1

to promote local actin assembly [64]. Recent findings support a role for the ubiquitin system in the targeting and removal of a cytoskeletal adaptor protein from the cortex at the G2/M border to favor mitotic changes in actin network architecture [65]. This suggests the existence of cell cycle-regulated mechanisms for recognition of cytoskeletal proteins that need to be segregated at a precise time. BAG3, HSPB8 and p62 are good candidate components of such mechanism. Of note, autophagy, like almost all membrane transport processes, is downregulated at mitotic entry and resumes to some extent during cytokinesis [66, 67]. Therefore, segregation of cytoskeletal components to inclusions could serve to remove proteins from their functionally relevant site(s) in early mitosis, at a time when the burden on the ubiquitin-proteasome system is high, until they can be properly disposed or recycled after mitotic exit.

While the link with p62 suggests a mechanism related to the activity of BAG3-HSPB8 in autophagic sequestration, it might also be that the BAG3-HSPB8 complex participates to mitotic cell remodeling via independent, non-canonical mechanism. The mitotic effect of BAG3 was found here to depend on BAG3 PXXP motif, which mediates interactions with the Src homology 3 (SH3) domain of a number of signaling proteins that are components of actin-based motility pathways. For instance, BAG3, via its PXXP motif, interacts with the SH3 domain of the oncogenic tyrosine kinase Src, a crucial signaling hub controlling cell shape that promotes spindle orientation in early prometaphase [37, 68, 69]. Thus an HSPB8-dependent activity of BAG3 could provide a platform to facilitate recruitment and assembly-disassembly of mitotic-specific cytoskeletal complexes, similar to the HSC70-dependent effect of BAG3 in muscle cells, which promotes recruitment of CapZ to the Z-disk and stability of F-actin [22]. HSPB8 was found here to facilitate proper localization of BAG3 at the G2/M phase and its subsequent phosphorylation at mitotic entry, perhaps on residues that could alter PXXP-dependent interactions. A systematic analysis of the contribution of site-specific phosphorylation events on BAG3 is warranted. The autophagic sequestration and the scaffolding models are not mutually exclusive and could contribute for the mitotic effects of BAG3-HSPB8. Beyond its role in protein storage or turnover, p62 acts also as a protein scaffold for the formation of multiprotein complexes in various signaling pathways [70, 71]. Regardless of the exact mode of action of BAG3-HSPB8-p62 axis in mitotic cellular remodeling, we can reasonably speculate that BAG3 PXXP motif serves to recruit BAG3-HSPB8 chaperone complex to machineries controlling remodeling of the cytoskeleton at mitotic entry.

The existence of a tertiary complex formed by BAG3-HSPB8-p62 in mitotic cells is strongly supported by the data presented here. Depletion of either, BAG3, p62 or HSPB8, results in the same phenotype in mitotic cells. The effect seen at the level of retraction fibers is uncommon and highly unlikely to be nonspecific. Indeed, depletion of other BAG proteins did not generate the same mitotic defects at the level of retraction fibers. This is further bolstered by interaction data showing that BAG3 associations with HSPB8 and p62, but not with HSP70, are promoted in mitotic cell extracts. The molecular mode of interaction between BAG3 and p62 is unknown, but may include a number of shared protein partners. Notably, recruitment of HDAC6, another p62 partner protein, was also significantly enhanced in mitotic BAG3 complexes. To our knowledge, this is the first report of a link between BAG3 and HDAC6, a unique histone deacetylase that binds to dynein [72]. Beyond its role in the segregation and aggresome-targeting of misfolded proteins, HDAC6 possesses several cytoskeletal substrates of relevance for remodeling of actin-based mitotic structures and spindle orientation, including the actin-binding protein cortactin and α -tubulin [73, 74]. A potential interaction between BAG3 and dynein, which has been reported before, could be meaningful for spindle orientation [16, 53]. While we cannot exclude some effects on microtubule dynamics upon depletion of BAG3, we did not observe major changes in the levels and organization of spindle and astral microtubules (S6 Fig). Accordingly, we propose that actin-based structures are the prime targets of this novel

mitotic activity regulated by BAG3, based on the severe phenotypic changes observed at the level of actin-rich retraction fibers, cell morphology and cortex stability (e.g. blebbing) upon depletion of BAG3, HSPB8 or p62.

In conclusion, we have uncovered a novel role for BAG3-HSPB8 chaperone complex in mitotic cell-shape changes, spindle orientation and proper chromosome segregation in the context of rapidly dividing cells. Such function could be meaningful for tumor cell survival and their uncontrolled capacity to divide. Conceptually, engagement of a specialized chaperone activity in rapidly dividing tumor cells at mitosis could serve several purposes. It could prevent aggregation of cytoskeletal proteins damaged by repetitive cycles of polymerization-depolymerization, assist in the assembly of macromolecular complexes responsible for actin-based dynamics and/or promote the sequestration and/or autophagic elimination of damaged components of mitotic actin structures that are proposed to be under high stress throughout metaphase. Elucidation of the precise mechanism involved should contribute to further our understanding of the apparent addiction of some cancer cells to the co-chaperone activity of BAG3 that might support uncontrolled cell division in the face of high mitotic stress experienced by most malignant cells.

Materials and Methods

Expression vectors, recombinant adenoviruses and baculoviruses

BAG3-GFP constructs were obtained by subcloning the EcoRI/BamHI fragments of myc-BAG3 constructs (WT, BAG3 [Δ421–498] or IPV [I96V/V98G/I208G/V210G] (described in [15, 38]) into the pEGFP-N1 vector (Clontech laboratories Inc.). To circumvent possible folding problems upon direct fusion of GFP to BAG3, GFP sequences were fused to the carboxyl terminus of BAG3 by engineering a glycine/serine-rich flexible linker (GSGS) peptide that distanced the GFP moiety from the rest of the BAG3 protein as described [75]. BAG3 ΔPXXP (Δ302–418) and BAG3 (R480A) were generated by PCR using the resulting BAG3-GFP as template and the following primers: 302-rev: 5'-CCT GTC GAC CAC GGT GTG CAC ACG G-3' and 418-gen: 5'-Phosphate-CAT CCA GGA GTG CTG AAA GTG GAA GCC-3'; 480A-gen: 5'-GAT GTG CGT CAG GCC GCG AGA GAC GGT GTC-AG-3' and 5'-CTG ACA CCG TCT CTT GCG GCC TGA CGC ACA TC-3'. HSPB8-RFP bears a glycine/serine-rich flexible linker peptide (GSGS) that distances the RFP moiety from the rest of the HSPB8 protein and was generated by subcloning the BglII/KpNI fragment of human HSPB8 that had been amplified in phase with a GSGS linker by PCR, in pmRFP-C1 (Clontech laboratories Inc.). The following primers were used: HSPB8.gen 5'-GAA GAT CTG AAA TGG CTG ACG GTC AGA TGC CCT TCT CC-3' HSPB8_{gsgs}.rev 5'-CGG GTA CCG CCG AGC CGG TAC AGG TGA CTT CCT GGC TGT CCT G-3'. All constructs were confirmed by DNA sequence analyses. Recombinant adenoviruses for expression of BAG3-GFP proteins and HSPB8-RFP as single gene products were produced by Welgen Inc, Worcester, MA, and were amplified in the HEK293VR, as described before [76]. All recombinant adenoviruses were confirmed by sequencing of the inserted sequences. Virus titers were determined using the AdenoX Rapid titer kit (Clontech Laboratories, #631028) following the manufacturer's instructions. The Cell-Light BacMam 2.0 ready to use reagents Bac-GFP-actin (C10582), Bac-RFP-actin (C10583), Bac-RFP-αtubulin (C10614) and Bac-GFP-α-tubulin (C10509) (Life Technologies), and the Adenovirus LifeAct-TagGFP2 (60121, IBIDI), were utilized for live-cell imaging experiments.

Antibodies and chemicals

The following antibodies and drugs were used: rabbit anti-BAG3 LP9 was raised against a C-terminal peptide (SSMTDTPGNPAAP), rabbit anti-BAG3 LP11 was raised against full length

recombinant human BAG3 fused with glutathione S transferase (LP11), and rabbit anti-HSPB8 against a C-terminal peptide (NELPQDSQEVCT) [15]; human anti-CREST (Immuno Vision); anti-HSC-70 (sc-1059), anti-HDAC6 (sc-11420), anti-cyclin B1 (sc-245), anti-GFP for Western blot (sc-9996), anti-Mad2 (sc-65492) and anti-p62 (sc-28359), anti-BAG1 (sc-33704) and anti-BAG2 (sc-366091) were from Santa Cruz Biotechnology; anti- α -tubulin (Abcam, ab18251); anti-a-tubulin (T5168), Hoechst Bisbenzimidazole H 33342 (B2261), anti-g-tubulin (T6557, Clone GTU-88) and anti-vinculin (V9131) were from Sigma; Alexa-Fluor 488 Phalloidin (A12379), Texas Red-X Phalloidin (T-7471) and anti-GFP for IP (A-11120) were from Molecular Probes/Thermo Fisher; anti-calreticulin (BD, #612136); anti-GAPDH Clone 6C5 (Fitzgerald, #10R-G109a); anti-phospho-Histone 3 Ser10 and anti-ubiquitin (clone FK2, #02-263) were from Millipore; anti-CEP170 (Invitrogen, #413200); anti-HSPB5/aB-crystallin (SPA222) and anti-HSP70 (SPA810) were from StressGene; anti-H3 (gift from A. Ruiz-Carrillo). Culture dishes were coated with Fibronectine (10 μ g/ml; Sigma, F1141) or Poly-L-Lysine (1 mg/ml; Sigma, P1399). Sodium arsenite, E64d, pepstatin A, Cytochalasin D, RO-3306 (SML0569) and MG132; Z-leu-leu-leu-al (C2211) were from Sigma, and Rapamycin was from Calbiochem.

Cell culture, transfection and cell synchronization

293T cells [77] were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS). HEK293VR cells contain the tetracycline repressor to allow efficient replication of recombinant adenoviruses carrying toxic genes (a generous gift from Philip E. Branton, McGill University) and were cultured in a-minimal essential medium (a-MEM) with 10% FBS. HeLa [78], HeLa-GFP-H2B (a generous gift from Laurence Pelletier) [79], and HeLa-RFP-H2B [80] cell lines were maintained in a-MEM with 10% FBS. MCF7 cells were maintained in a-MEM supplemented with 10% FBS. Cells were grown in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. HeLa cells were transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. HeLa cell lines were synchronized in G1 by a double Thymidine block and were released for 7 h in fresh medium. Briefly, cells were incubated with 2 mM Thymidine (Sigma, T9250) in a-MEM without Desoxyribonucleosides/Ribonucleosides supplemented with 10% FBS (aMEM minus) for 16 h, were washed 3-times and released in fresh medium. After the second block, cells were released in a-MEM supplemented with 10% FBS. Thymidine/nocodazole block was performed to increase the proportion of cells in mitosis by a 24 h-incubation period with 2 mM Thymidine followed by a 3 h-release period in fresh medium; cells were then synchronized in early mitosis by a 16 h-treatment with nocodazole (40 ng/ml; Calbiochem). Mitotic cell extracts were prepared from cells recovered mechanically by mitotic shake off. Cells were synchronized in G2/M by a 24 h-Thymidine block followed by a 3-h release in fresh medium and incubation with RO-3306 (8 μ M) for 18 h.

Knockdown-rescue experiments and siRNAs

For knockdown experiments, HeLa cells were transfected with 50 nM or 75 nM siRNA duplexes overnight using the calcium-phosphate method, MCF7 cells were transfected with 75 nM siRNA duplexes using Transit-TKO (Invitrogen) following the manufacturer's instructions, and analyses were performed 48 h to 96 h later by Western blot or immunofluorescence. We developed a protocol called adenofection to perform depletion-rescue experiments and co-introduce low, non-interfering levels of GFP-actin and RFP- α -tubulin compatible with live cell imaging. HeLa-RFP-H2B cells seeded on fibronectin-coated glass dishes (MatTek Corp.) were infected with Ad-BAG3-GFP at a multiplicity of infection (MOI) of 2 plaque-forming units per cell (pfu/cell) together with BacMam 2.0 reagents at 4 pfu/cell in a-MEM minus medium

containing 2 mM Thymidine. Two hours later, siRNA duplexes directed to the 3'-UTR (siBag3_3) were added in calcium-phosphate transfection buffer (50–75 nM in 125 mM MgCl₂, 140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 0.75 mM Na₂HPO₄). Simultaneous transfection-infection allows efficient virus transduction at low MOI. Sixteen hours post adenofection, cells were washed 3-times with HEPES (6.7 mM KCl, 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7.3) and were released from the Thymidine block in fresh a-MEM minus medium for 7 h before adding back 2 mM Thymidine for a second 16 h-period. Cells were washed 3-times with phosphate buffer saline (PBS) and were released in complete a-MEM w/o Phenol Red. Live cell imaging was performed 7–9 h later. Where indicated in the figure legends, ConA (100 µg/ml; Sigma, L3885) was added 20 min before imaging. The siRNA duplexes were based on human sequences and were purchased from Qiagen (HPP grade siRNA) or Thermo Fisher Scientific (standard A4 grade). Sequences of the sense strands are as follows: siBag3_1: 5'-CGAAGAGTATTTGACC AAA-3' (Qiagen); siBag3_2: 5'-GCAAAGAGGTGGATTCTAA-3' (Thermo Fisher Scientific); siBag3_3: 5'-GATGTGTGCTTTAGGGAAT-3' (Thermo Fisher Scientific); sip62_1: 5'-GGAA ATGGGTCCACCAGGATT-3' (Thermo Fisher Scientific); sip62_2: 5'-AGACCAAGAAGCTA TGACAT-3' (Thermo Fisher Scientific); siHspB8_1: 5'-CAGATAGGCTAGTGGTATT-3' (Thermo Fisher Scientific); siHspB8_2: 5'-GCAGTGAATGCAAGGGTTATT-3' (Thermo Fisher Scientific); siHspB8_3: 5'-CAGAGGAGTTGATGGTGAA-3' (Thermo Fisher Scientific); Control siRNA (siCtl): AllStars Negative Control was purchased from Qiagen, target sequence: 5'-CAGGGTATCGACGATTACAAA-3'; siBAG1_1: 5'-AACCAGTTGTCCAAGA CCT-3'; siBAG1_2: 5'-GCACGACCTTCATGTTACC-3'; siBAG2_2: 5'-AGCCAGGACATGA GGCAGA-3; siBAG2_3: 5'-TCAGAAGTTTCAATCCATA-3'.

Cell fractionation, immunoprecipitation and phosphatase assay

Centrosomes isolation from asynchronous HeLa cells, or from cells arrested in mitosis by a 16 h-treatment with nocodazole (400 ng/ml), was performed essentially as described [81]. Briefly, cells extracts were prepared by hypotonic lysis et fractionated by sequential centrifugation on 50% sucrose cushion, followed by centrifugation on a step gradient of 70%, 50%, and 40% sucrose. The fractions containing centrosomes were centrifuged and centrosome pellets were processed for SDS-PAGE and Western blot. For immunoprecipitation, equal amounts of cells were washed in ice-cold PBS and were lysed by 3-cycles of freezing/thawing in 4-volume of lysis buffer (20 mM TRIS-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% IGEPAL, 1 mM NaVO₄, 10 mM NaF, 40 mM β-glycerophosphate, 1X Complete [Roche], 1 mM DTT) (Figs 4D and 5G), or in NP40 buffer (20 mM TRIS-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% IGEPAL, 1X Complete [Roche], 1 mM DTT) (Figs 1C and 4B). Cell extracts were centrifuged at 15,000 g for 15 min, the supernatants were transferred to a fresh tube and incubated with specific antibody for 60 min at 4°C, after which they were transferred to a tube containing the Dynabeads protein A (Life Technologies) pre-equilibrated in lysis buffer. After incubation for 30 min with gentle agitation, immuno-complexes were collected using a magnetic stand and washed 3-times in lysis buffer. Equal amounts of immune complexes were loaded on SDS-PAGE and analysed by Western blot as described before [82]. Phosphatase assay were performed in vitro by incubating BAG3 IPs in buffer (25 mM HEPES pH 7.5, 1 mM MnCl₂, 5 mM NaCl, 0.005% Brij35, 1 mM DTT) supplemented with 200 unit of l-phosphatase (New England Biolabs) with or without phosphatase inhibitors (50 mM NaF, 10 mM NaVO₄, 40 mM β-glycerophosphate, 50 mM EDTA), for 60 min at 30°C. BAG3 migration was analyzed on 8% SDS-PAGE, by Western blot. Protein concentrations were determined with DC protein assay reagent and densitometric analyses were performed from FluorS MAX MultiImager-captured images using the QuantityOne software version 4.5.0 (Bio-Rad Laboratories).

Immunofluorescence, microscopy, live cell imaging and statistical analyses

DNA was stained with cell-permeable Hoechst and F-actin was stained with Alexa Fluor phalloidin (Molecular Probes/ Thermo Fisher Scientific, Ottawa, On. CA). For IF, cells were gently washed in Luftig buffer (0.2M sucrose, 35mM PIPES, pH 7.4, 5mM EGTA, 5mM MgSO₄) and fixed in buffer containing 4% formaldehyde in 0.2% Triton X-100, 20 mM Pipes, pH 6.8, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, pH 8.0, 4% formaldehyde for 10 min at RT. Specimens were then processed for IF as described [83], using the indicated primary antibodies and Alexa Fluor goat anti-rabbit or goat anti-mouse antibodies. Phenotypes were monitored routinely by at least two independent investigators by visual inspection of fixed specimens. Epifluorescence images were acquired with an AxioObserver Z1 system using a 40x Plan-Neofluar 0.6NA objective and a charged-coupled device (CCD) camera AxioCam MRM controlled by the Zen software (Carl Zeiss). For measuring the a angle, centrosomes were stained with anti γ -tubulin antibody. Confocal z -stacks were acquired at 0.5 μ m steps and the spindle angle a was estimated from the spindle axis between the two centrosomes relative to the surface of the substrate according to the formula: $a = 180^\circ/\pi * \arctan a/b$. Confocal microscopy of live and fixed cells was performed with a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal (60x oil 1.4 NA, or 40x 0.75NA), equipped with an EMCCD cooled charge-coupled camera at -50°C (Hamamatsu Photonics K. K) and driven by Volocity software version 6.01. The system was equipped with a humidified/5% CO₂/thermoregulated chamber. Mitotic phenotypes were estimated by visual inspection of time-sequences. For live cell imaging, HeLa-GFP-H2B or HeLa-RFP-H2B were seeded on fibronectin-coated glass dishes (MatTek Corporation, USA) and processed as indicated in the Figure legends before imaging using spinning disc confocal microscopy with a 40x 0.75 NA objective. Long-term imaging of asynchronous HeLa-GFP-H2B cells was performed using a Nikon TE-2000 inverted microscope equipped with a CO₂/thermo-regulated chamber and a 40x 0.6 NA objective. Images were captured as 16 bit TIFF files with a Photometrix Coolsnap FX cooled CCD camera (-30°C) (Rooper Scientific, Tucson AZ) driven by the Metaview software version 4.5 (Universal Imaging Corp., Downingtown, PA). Images were acquired at 10 min intervals for a 48 h-period starting at 40 h posttransfection. Mitotic pedigrees for families of daughter cells were established by tracking the genealogy of individual cells, by visual inspection of time-sequences. The numbers of mitotic events were scored and the time spent in mitosis: from nuclear envelope breakdown to anaphase onset, and defects in mitosis as followed: misalignment of chromosomes or chromosomes delayed at spindle poles; lagging chromosomes; multipolar spindle and were estimated from individual cells from independent experiments. For TIRFM, cells were plated on gelatine- or fibronectine-coated glass dishes (MatTek Corporation, USA). Images were acquired using a Nikon Ti microscope equipped with a laser TIRF system controlled by the software NIS-Elements AR, a Apo TIRF 60x Oil DIC N2 objective and an Andor DU-897 X-7889 camera. The volocity software version 6.0 (Quorum Technologies) and Image J 1.48v (National Institute of Health) were used for processing on entire images before cropping to emphasize the main point of the image. Processing was limited to background subtraction, brightness/contrast adjustment and deconvolution. For experiments examining (a) the time spent in mitosis, (b) cells undergoing defective mitosis, or (c) incidence of multinucleation, the mean values of individual experiments were analyzed using the Mann-Whitney test, which is a nonparametric test that compares two unpaired groups of ordinal or numerical variables. For experiments examining (a) mitotic stages, (b) spindle angle a , or (c) for depletion-rescue experiments, data were analyzed using the Fisher's exact test, which is used for small sample sizes with nominal/categorical variables. Statistical calculations were performed using Prism 6.0 (GraphPad Software) statistical software.

Supporting Information

S1 Fig. Cells depleted of BAG3 show abnormal mitotic progression and nuclear abnormalities. (A) Representative mitotic pedigrees of HeLa-GFP-H2B transfected with control siRNA or Bag3 siRNA. Cells were imaged starting at 40 h after transfection for a 48 h-time period at 10 min-intervals. Each row represents the mitotic pedigree of a daughter cell, and rows are organized by families. The genealogy of cells was tracked to recapitulate their mitotic histories and to estimate the time spent in mitosis and mitotic defects; related to Fig 2B and 2C. (B, C) Western blot showing reduced levels of BAG3 in MCF7 cells treated with BAG3-specific siRNAs. The graph shows the incidence of multinucleation, which was estimated 72 h to 96 h after transfection from 2 independent experiments; n>500 cells.

(TIF)

S2 Fig. Representative epifluorescence images of HeLa-RFP-H2B cells that have been transduced with recombinant adenoviruses driving the expression of BAG3-GFP proteins compared to GFP alone. Localization was analyzed 20 h post-infection; Bars, 20 μ m.

(TIF)

S3 Fig. Mutant BAG3 (R480A) is unable to restore aggresome-targeting of ubiquitinated protein aggregates in BAG3-depleted cells. Knockdown-rescue experiments were performed according to the protocol described in Fig 4 in HeLa-RFP-H2B cells submitted to a proteasomal stress that triggers aggresome-targeting of ubiquitinated proteins in a BAG3-dependent way (MG132 5 μ M, 16 h). Deconvolved fluorescence images show representative distributions of proteins stained with anti-ubiquitin that accumulated to a perinuclear aggresome in cells treated with control siRNA (marked by arrowheads), but remained in small cytoplasmic aggregates in cells depleted of BAG3. Please note that introduction of BAG3-GFP, but not BAG3 (R480A)-GFP or GFP alone, could restore aggresome formation in BAG3-depleted cells. Bar, 10 μ m.

(TIF)

S4 Fig. (A, B) HeLa-RFP-H2B cells were synchronized in mitosis by a double Thymidine-block followed by a 7 h-release period and were processed for staining of kinetochores (CREST staining), spindle microtubules (a-tubulin staining) and Hoechst. Graph depicts the percentages of cells at different stages of mitosis upon treatment with HSPB8-specific siRNAs (A) or p62-specific siRNA (B); (A) siCTL, n = 610 cells; siBAG3_3, n = 306; siHSPB8_3, n = 181 cells; siHSPB8_2; n = 308 cells; (B) siCTL, n = 319 cells; siBAG3_3, n = 306 cells; sip62_2, n = 118 cells. (C) Deconvolved image stacks of R0-3306-treated HeLa cells infected with Ad-BAG3-GFP and Ad-RFP; red arrows designate a defined spherical perinuclear space enriched in BAG3-GFP, but not in RFP, in G2-arrested cells. (D) Western blots of total lysates prepared from nocodazole-arrested HeLa-RFP-H2B cells that have been transduced with the indicated Ad-BAG3-GFP vectors alone or with Ad-HSPB8-RFP, showing partial supershift of the BAG3 (IPV)-GFP.

(TIF)

S5 Fig. Retraction fiber distribution is not significantly affected in cells depleted of BAG1 or BAG2, unlike cells depleted of BAG3. (A) Western blots of extracts of HeLa cells showing specific depletion of either BAG1, BAG2 or BAG3, after transfection of the indicated siRNAs (75 nM; 48 h); anti-BAG1 antibody recognized 3 BAG1 isoforms in HeLa cells. GAPDH levels: loading control. (B) Western blots of extracts prepared from asynchronous or nocodazole-arrested mitotic HeLa-RFP-H2B cells (40 ng/ml, 16 h). (C) Representative TIRFM images from HeLa cells at metaphase transfected with the indicated siRNAs for 48 h and transduced

with BacMam-RFP-actin. Please note that unlike cells treated with BAG3-specific siRNA, cells treated with BAG1- or BAG2-specific siRNA presented numerous actin dots showing a circumferential distribution like those found in control cells, which are emphasized in enlarged views of the boxed regions and designated by red arrows. (D) Deconvolved confocal images of siRNA-treated HeLa-RFP-H2B cells transduced with Ad-LifeAct-GFP and BacMam-GFP- α -tubulin. Cells were synchronized by the double Thymidine-block method and imaged 48 h after transfection. Bars, 10 μ m.

(TIF)

S6 Fig. (A) Graph depicting spindle microtubule intensity in HeLa-RFP-H2B cells treated with control siRNA compared to BAG3-specific siRNA; means of two independent experiment +/- SE are indicated. siRNA-treated cells were synchronized with a double Thymidine block and processed for α -tubulin, cytochrome c and Hoechst staining. K-fiber intensities were calculated from confocal stacks covering the whole spindle in individual cells and normalized to cytochrome c staining in each cell (represented by individual dots) using the Volocity software. (B) Representative confocal image stacks of HeLa-RFP-H2B cells treated with the indicated siRNA, showing α -tubulin, γ -tubulin, CREST and Hoechst staining. Please note that cells depleted of BAG3 showing abnormal chromosome congression (designate by arrows) did not exhibit major abnormalities in astral microtubules; Bars, 10 μ m.

(TIF)

S1 Movie. Related to Fig 3B—Spindle dynamics in control HeLa cells. Video microscopy of a representative HeLa cells transfected with control siRNA (siCtl) expressing low levels of RFP- α -tubulin and GFP-actin. Mitotic cells were imaged for a 1 h-period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.

(MOV)

S2 Movie. Related to Fig 3B—BAG3 depletion impairs mitotic spindle dynamics. Video microscopy of a representative siBAG3-treated HeLa cells expressing RFP- α -tubulin and GFP-actin, which show characteristic defects in mitotic spindle dynamics upon depletion of BAG3 (siBAG3). Mitotic cells were imaged for a 1 h-period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.

(MOV)

S3 Movie. Related to Fig 3B—BAG3 depletion impairs mitotic spindle dynamics. Video microscopy of a representative siBAG3-treated HeLa cells expressing RFP- α -tubulin and GFP-actin, which show characteristic mitotic spindle rocking upon depletion of BAG3 (siBAG3). Mitotic cells were imaged for a 1 h-period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.

(MOV)

S4 Movie. Related to Fig 4F—Spindle behavior upon introduction of GFP in BAG3-depleted cells. Video microscopy of a representative HeLa-RFP-H2B cells expressing low levels RFP- α -tubulin, which have been processed for knockdown-rescue. Mitotic cells expressing comparable levels of GFP alone were imaged for a 1 h to 1.5 h-time periods at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.

(MOV)

S5 Movie. Related to Fig 4E and 4F—Spindle behavior upon introduction of wild type BAG3-GFP in BAG3-depleted cells. Video microscopy of a representative HeLa-RFP-H2B cells expressing low levels RFP-a-tubulin, which have been processed for knockdown-rescue. Mitotic cells expressing comparable levels of Bag3-GFP and variable expression of RFP-H2B were imaged for a 1 h to 1.5 h-time periods at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.
(MOV)

S6 Movie. Related to Fig 4E and 4F— Mitotic spindle phenotype upon introduction of BAG3-GFP (IPV) unable to bind to HSPB8 in BAG3-depleted cells. Video microscopy of a representative HeLa-RFP-H2B cells expressing low levels RFP-a-tubulin, which have been processed for knockdown-rescue. Mitotic cells expressing comparable levels of Bag3-GFP (IPV) and variable expression of RFP-H2B were imaged for a 1 h to 1.5 h-time periods at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.
(MOV)

S7 Movie. Related to Fig 4G—Mitotic spindle phenotype upon introduction of BAG3-GFP (R480A) unable to bind to HSC70/HSP70 in BAG3-depleted cells. Video microscopy of a representative HeLa-RFP-H2B cells expressing low levels RFP-a-tubulin, which have been processed for knockdown-rescue. Mitotic cells expressing comparable levels of Bag3-GFP (R480A) and variable expression of RFP-H2B were imaged for a 1 h to 1.5 h-time periods at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.
(MOV)

S8 Movie. Related to Fig 4G—Mitotic spindle phenotype upon introduction of GFP in control cells. Video microscopy of a representative HeLa-RFP-H2B cells expressing low levels RFP-a-tubulin, which have been adenofected with sicontrol and GFP alone. Mitotic cells expressing comparable levels GFP alone and variable expression of RFP-H2B were imaged for a 1 h to 1.5 h-time periods at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.
(MOV)

S9 Movie. Related to Fig 5B—Video microscopy of a representative mitotic HeLa cells transfected with siCtl, showing normal spindle behavior. Mitotic cells expressing low levels of GFP-a-tubulin were imaged for a 1h-time period at 1.5 min intervals; single plane images are displayed at 7 frames/sec.
(MOV)

S10 Movie. Related to Fig 5B—Cells depleted of HSPB8 undergo abnormal rocking of the mitotic spindle. Video microscopy of a representative mitotic HeLa cells transfected with HSPB8-specific siRNA, showing abnormal spindle motility. Mitotic cells expressing low levels of GFP-a-tubulin were imaged for a 1h-time period at 1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.
(MOV)

S11 Movie. Related to Fig 5B—Cells depleted of HSPB8 undergo abnormal rocking of the mitotic spindle. Video microscopy of a representative mitotic HeLa cells transfected with HSPB8-specific siRNA, showing abnormal spindle motility. Mitotic cells expressing low levels

of GFP- α -tubulin were imaged for a 1h-time period at 1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.

(MOV)

S12 Movie. Related to Fig 6B—Video microscopy of a representative mitotic HeLa cells transfected with siCtI expressing low levels of GFP- α -tubulin and RFP-actin that was imaged for a 1h-time period at 1.5 min intervals; single plane images are displayed at 7 frames/sec.

(MOV)

S13 Movie. Related to Fig 6B—Depletion of p62 mimics the BAG3-HSPB8-dependent phenotype on spindle dynamics. Video microscopy of a representative mitotic HeLa cells transfected with sip62, showing abnormal spindle rocking upon depletion of p62. Mitotic cells expressing low levels of GFP- α -tubulin and RFP-actin were imaged for a 1h-time period at 1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective; single plane images are displayed at 7 frames/sec.

(MOV)

S14 Movie. Related to Fig 7D—Mitotic cortex stability in control cells. Video microscopy of a representative HeLa-RFP-H2B cell transfected with siCtI and transduced with BacMam-GFP- α -tubulin and RFP-actin; cells were imaged for a 1 h-time period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective and single plane images are displayed at 7 frames/sec. Please note that RFP-H2B expression is variable in this cell line.

(MOV)

S15 Movie. Related to Fig 7D—siBAG3-treated cells show spectacular blebbing of the mitotic cortex along with displacement of the mitotic spindle pushed into the bleb. Video microscopy of a representative HeLa-RFP-H2B cell transfected with siBAG3 and transduced with BacMam-GFP- α -tubulin and RFP-actin; cells were imaged for a 1 h-time period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective and single plane images are displayed at 7 frames/sec. Please note that RFP-H2B expression is variable in this cell line.

(MOV)

S16 Movie. Related to Fig 7D—Cells transfected with sip62 show dramatic blebbing of the mitotic cortex associated with mitotic spindle motility. Video microscopy of a representative HeLa-RFP-H2B cell transfected with sip62 and transduced with BacMam-GFP- α -tubulin and RFP-actin; cells were imaged for a 1 h-time period at ~1.5 min intervals using a Perkin Elmer UltraVIEW Spinning Disc Confocal and 40x air 0.75NA objective and single plane images are displayed at 7 frames/sec. Please note that RFP-H2B expression is variable in this cell line.

(MOV)

S1 Dataset. Individual data point values from analyses of the complete time-lapse images.

This dataset contains ten spreadsheets summarizing the data from complete time-lapse images. The spreadsheets “Fig 2B and 2C” list individual data point values from time-lapse analyses of unsynchronized HeLa-GFPH2B cells. They report mitotic pedigrees for daughter cells called by their family ID number xyz , where x is family number of the mother cell, y is daughter cell number on first division and z is daughter cell number on second division, etc. . . The time spent in mitosis and cytokinesis/interphase (in min) and the numbers of normal (highlighted in grey) and defective (highlighted in red) mitotic events according to the criteria listed in Fig 2

legend are listed for individual cells. The spreadsheets related to Figs 3C, 5C and 6C present cells from individual time-lapse experiments (Exp_1 to Exp_6) with their ID (field and position), mitotic progression (delineated by time-sequence intervals $Tx-y$ min), and mitotic phenotype defined as spindle rocking (yellow color), stalled in mitosis +/- spindle rocking (blue color), or others (chromosome misalignment or multipolar spindle; red color). The spreadsheet related to Fig 3E presents the individual data point values for cell spindle angle from independent experiments (Exp). The spreadsheets related to Fig 4F and 4G list cells from individual depletion-rescue experiments with their ID, mitotic progression (defined by time-sequence intervals $Tx-y$ min) and mitotic phenotype: either normal highlighted in grey or defective highlighted in red (defined as spindle rocking, stalled in mitosis +/- spindle rocking, or chromosome misalignment). The spreadsheet related to Fig 7E reports all cells from individual experiments (Exp) with their ID, mitotic progression (defined by time-sequence intervals $Tx-y$ min) and mitotic phenotype defined as normal (in grey), blebbing (in blue), rocking and blebbing (in yellow) or other mitotic defects (in red; mitotic delay, multipolar spindle or chromosome misalignment). The spreadsheet related to Fig 8C lists individual cells transfected with siCtl or siBAG3, that have been treated with Concanavilin A (CON A) or the vehicle for a short time-period before imaging, with their ID, mitotic progression (defined by time-sequence intervals $Tx-y$ min) and mitotic phenotype: either normal (in grey) or defective (in red; defined as spindle rocking, mitotic arrest +/- rocking, cortex blebbing and/or chromosome misalignment). (XLSX)

Acknowledgments

The authors wish to mention that the centrosomal localization of BAG3 using anti-BAG3 antibodies was also observed in experiments done by Serena Carra at the time she was postdoc in Jacques Landry's laboratory. We are grateful to Philip E. Branton (McGill University, Montreal, Canada), Laurence Pelletier (The Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Toronto, Canada) and Jean-Yves Masson (Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, Quebec, Canada) for providing critical reagents. We thank Marc-Étienne Huot for sharing the TIRF microscopic system, Carl St-Pierre and Anne Loranger (Centre de recherche sur le cancer de l'Université Laval, HDQ) for their assistance in microscopic analyses.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MF HL JL JNL. Performed the experiments: MF HL CL SMG AAV. Analyzed the data: MF HL CL SMG AAV AJ SE JL JNL. Wrote the paper: MF SE JL JNL.

References

1. Saibil H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14(10):630–42. Epub 2013/09/13. doi: [10.1038/nrm3658](https://doi.org/10.1038/nrm3658) PMID: [24026055](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24026055/)
2. Quinlan RA, Ellis RJ. Chaperones: needed for both the good times and the bad times. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 2013; 368(1617):20130091. Epub 2013/03/27. doi: [10.1098/rstb.2013.0091](https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0091) PMID: [23530265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23530265/)
3. Taipale M, Tucker G, Peng J, Krykbaeva I, Lin ZY, Larsen B, et al. A quantitative chaperone interaction network reveals the architecture of cellular protein homeostasis pathways. *Cell.* 2014; 158(2):434–48. Epub 2014/07/19. doi: [10.1016/j.cell.2014.05.039](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.039) PMID: [25036637](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25036637/)
4. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell.* 2009; 136(5):823–37. doi: [10.1016/j.cell.2009.02.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.024) PMID: [19269363](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19269363/)

5. Tang Z, Dai S, He Y, Doty RA, Shultz LD, Sampson SB, et al. MEK guards proteome stability and inhibits tumor-suppressive amyloidogenesis via HSF1. *Cell*. 2015; 160(4):729–44. Epub 2015/02/14. doi: [10.1016/j.cell.2015.01.028](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.028) PMID: [25679764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25679764/)
6. Basha E, O'Neill H, Vierling E. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci*. 2012; 37(3):106–17. Epub 2011/12/20. doi: [10.1016/j.tibs.2011.11.005](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.11.005) PMID: [22177323](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22177323/)
7. McHaourab HS, Godar JA, Stewart PL. Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry*. 2009; 48(18):3828–37. Epub 2009/03/28. doi: [10.1021/bi900212j](https://doi.org/10.1021/bi900212j) PMID: [19323523](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19323523/)
8. Kampinga HH, Garrido C. HSPBs: small proteins with big implications in human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012; 44(10):1706–10. Epub 2012/06/23.
9. Guilbert Solenn M., Varlet Alice-Anais, Fuchs Margit, Lambert Herman, and L J, Lavoie JN. Regulation of Actin-Based Structure Dynamics by HspB Proteins and Partners. In: *The Big Book of Small Heat Shock Proteins*. Editors Tanguay R.M. and Hightower L.E.. ISBN: 978-3-319-16076-4.: Springer international Publishing AG 2015.
10. Garrido C, Paul C, Seigneuric R, Kampinga HH. The small heat shock proteins family: the long forgotten chaperones. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2012; 44(10):1588–92. Epub 2012/03/28.
11. Carra S, Seguin SJ, Landry J. HspB8 and Bag3: a new chaperone complex targeting misfolded proteins to macroautophagy. *Autophagy*. 2008; 4(2):237–9. Epub 2007/12/21. PMID: [18094623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18094623/)
12. Knezevic T, Myers VD, Gordon J, Tilley DG, Sharp TE 3rd, Wang J, et al. BAG3: a new player in the heart failure paradigm. *Heart failure reviews*. 2015. Epub 2015/05/01.
13. Rosati A, Graziano V, De Laurenzi V, Pascale M, Turco MC. BAG3: a multifaceted protein that regulates major cell pathways. *Cell death & disease*. 2011; 2:e141. Epub 2011/04/08.
14. Kabbage M, Dickman MB. The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65(9):1390–402. Epub 2008/02/12. doi: [10.1007/s00018-008-7535-2](https://doi.org/10.1007/s00018-008-7535-2) PMID: [18264803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18264803/)
15. Carra S, Seguin SJ, Lambert H, Landry J. HspB8 chaperone activity toward poly(Q)-containing proteins depends on its association with Bag3, a stimulator of macroautophagy. *J Biol Chem*. 2008; 283(3):1437–44. Epub 2007/11/17. PMID: [18006506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18006506/)
16. Gamerding M, Kaya AM, Wolfrum U, Clement AM, Behl C. BAG3 mediates chaperone-based aggregate-targeting and selective autophagy of misfolded proteins. *EMBO Rep*. 2011; 12(2):149–56. Epub 2011/01/22. doi: [10.1038/embor.2010.203](https://doi.org/10.1038/embor.2010.203) PMID: [21252941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21252941/)
17. Xu Z, Graham K, Foote M, Liang F, Rizkallah R, Hurt M, et al. 14-3-3 protein targets misfolded chaperone-associated proteins to aggresomes. *J Cell Sci*. 2013; 126(Pt 18):4173–86. Epub 2013/07/12. doi: [10.1242/jcs.126102](https://doi.org/10.1242/jcs.126102) PMID: [23843611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23843611/)
18. Minoia M, Boncoraglio A, Vinet J, Morelli FF, Brunsting JF, Poletti A, et al. BAG3 induces the sequestration of proteasomal clients into cytoplasmic puncta: implications for a proteasome-to-autophagy switch. *Autophagy*. 2014; 10(9):1603–21. Epub 2014/07/22. doi: [10.4161/auto.29409](https://doi.org/10.4161/auto.29409) PMID: [25046115](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25046115/)
19. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*. 2000; 10(12):524–30. Epub 2000/12/21. PMID: [11121744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11121744/)
20. Merabova N, Sariyer IK, Saribas AS, Knezevic T, Gordon J, Turco MC, et al. WW domain of BAG3 is required for the induction of autophagy in glioma cells. *Journal of cellular physiology*. 2015; 230(4):831–41. Epub 2014/09/11. doi: [10.1002/jcp.24811](https://doi.org/10.1002/jcp.24811) PMID: [25204229](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25204229/)
21. Homma S, Iwasaki M, Shelton GD, Engvall E, Reed JC, Takayama S. BAG3 deficiency results in fulminant myopathy and early lethality. *Am J Pathol*. 2006; 169(3):761–73. Epub 2006/08/29. PMID: [16936253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16936253/)
22. Hishiya A, Kitazawa T, Takayama S. BAG3 and Hsc70 interact with actin capping protein CapZ to maintain myofibrillar integrity under mechanical stress. *Circulation research*. 2010; 107(10):1220–31. Epub 2010/10/05. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.110.225649](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.225649) PMID: [20884878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20884878/)
23. Arndt V, Dick N, Tawo R, Dreiseidler M, Wenzel D, Hesse M, et al. Chaperone-assisted selective autophagy is essential for muscle maintenance. *Curr Biol*. 2010; 20(2):143–8. Epub 2010/01/12. doi: [10.1016/j.cub.2009.11.022](https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.11.022) PMID: [20060297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20060297/)
24. Selcen D, Muntoni F, Burton BK, Pegoraro E, Sewry C, Bite AV, et al. Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2009; 65(1):83–9. Epub 2008/12/17. doi: [10.1002/ana.21553](https://doi.org/10.1002/ana.21553) PMID: [19085932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19085932/)
25. Odgerel Z, Sarkozy A, Lee HS, McKenna C, Rankin J, Straub V, et al. Inheritance patterns and phenotypic features of myofibrillar myopathy associated with a BAG3 mutation. *Neuromuscular disorders*. 2010; 20(7):438–42. Epub 2010/07/08. doi: [10.1016/j.nmd.2010.05.004](https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.05.004) PMID: [20605452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20605452/)

26. Ingham RJ, Colwill K, Howard C, Dettwiler S, Lim CS, Yu J, et al. WW domains provide a platform for the assembly of multiprotein networks. *Mol Cell Biol*. 2005; 25(16):7092–106. Epub 2005/08/02. PMID: [16055720](#)
27. Li SS. Specificity and versatility of SH3 and other proline-recognition domains: structural basis and implications for cellular signal transduction. *Biochem J*. 2005; 390(Pt 3):641–53. Epub 2005/09/02. PMID: [16134966](#)
28. Iwasaki M, Tanaka R, Hishiya A, Homma S, Reed JC, Takayama S. BAG3 directly associates with guanine nucleotide exchange factor of Rap1, PDZGEF2, and regulates cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 400(3):413–8. Epub 2010/08/31. doi: [10.1016/j.bbrc.2010.08.092](#) PMID: [20800573](#)
29. Kassis JN, Virador VM, Guancial EA, Kimm D, Ho AS, Mishra M, et al. Genomic and phenotypic analysis reveals a key role for CCN1 (CYR61) in BAG3-modulated adhesion and invasion. *The Journal of pathology*. 2009; 218(4):495–504. Epub 2009/04/30. doi: [10.1002/path.2557](#) PMID: [19402132](#)
30. Kassis JN, Guancial EA, Doong H, Virador V, Kohn EC. CAIR-1/BAG-3 modulates cell adhesion and migration by downregulating activity of focal adhesion proteins. *Exp Cell Res*. 2006; 312(15):2962–71. Epub 2006/07/25. PMID: [16859681](#)
31. Kunda P, Baum B. The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol*. 2009; 19(4):174–9. Epub 2009/03/17. doi: [10.1016/j.tcb.2009.01.006](#) PMID: [19285869](#)
32. Rao X, Zhang Y, Yi Q, Hou H, Xu B, Chu L, et al. Multiple origins of spontaneously arising micronuclei in HeLa cells: direct evidence from long-term live cell imaging. *Mutation research*. 2008; 646(1–2):41–9. Epub 2008/10/11. doi: [10.1016/j.mrfmmm.2008.09.004](#) PMID: [18845170](#)
33. London N, Biggins S. Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(11):736–47. Epub 2014/10/11. doi: [10.1038/nrm3888](#) PMID: [25303117](#)
34. Toyoshima F, Nishida E. Integrin-mediated adhesion orients the spindle parallel to the substratum in an EB1- and myosin X-dependent manner. *EMBO J*. 2007; 26(6):1487–98. Epub 2007/02/24. PMID: [17318179](#)
35. Samora CP, Mogessie B, Conway L, Ross JL, Straube A, McAnish AD. MAP4 and CLASP1 operate as a safety mechanism to maintain a stable spindle position in mitosis. *Nat Cell Biol*. 2011; 13(9):1040–50. Epub 2011/08/09. doi: [10.1038/ncb2297](#) PMID: [21822276](#)
36. Ferreira JG, Pereira AJ, Akhmanova A, Maiato H, Aurora B spatially regulates EB3 phosphorylation to coordinate daughter cell adhesion with cytokinesis. *J Cell Biol*. 2013; 201(5):709–24. Epub 2013/05/29. doi: [10.1083/jcb.201301131](#) PMID: [23712260](#)
37. Colvin TA, Gabai VL, Gong J, Calderwood SK, Li H, Gummuluru S, et al. Hsp70-Bag3 interactions regulate cancer-related signaling networks. *Cancer Res*. 2014. Epub 2014/07/06.
38. Fuchs M, Poirier DJ, Seguin SJ, Lambert H, Carra S, Charette SJ, et al. Identification of the key structural motifs involved in HspB8/HspB6-Bag3 interaction. *Biochem J*. 2010; 425(1):245–55. Epub 2009/10/23.
39. Doong H, Vrilaas A, Kohn EC. What's in the 'BAG'?—A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer letters*. 2002; 188(1–2):25–32. Epub 2002/10/31. PMID: [12406544](#)
40. Doong H, Price J, Kim YS, Gasbarre C, Probst J, Liotta LA, et al. CAIR-1/BAG-3 forms an EGF-regulated ternary complex with phospholipase C-gamma and Hsp70/Hsc70. *Oncogene*. 2000; 19(38):4385–95. Epub 2000/09/12. PMID: [10980614](#)
41. Antoku K, Maser RS, Scully WJ Jr., Delach SM, Johnson DE. Isolation of Bcl-2 binding proteins that exhibit homology with BAG-1 and suppressor of death domains protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 286(5):1003–10. Epub 2001/08/31. PMID: [11527400](#)
42. Fontanella B, Birolo L, Infusini G, Cinulli C, Marzullo L, Pucci P, et al. The co-chaperone BAG3 interacts with the cytosolic chaperonin CCT: new hints for actin folding. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010; 42(5):641–50. Epub 2009/12/19.
43. Gentilella A, Khalili K. BAG3 expression in glioblastoma cells promotes accumulation of ubiquitinated clients in an Hsp70-dependent manner. *J Biol Chem*. 2011; 286(11):9205–15. Epub 2011/01/15. doi: [10.1074/jbc.M110.175836](#) PMID: [21233200](#)
44. Vassilev LT, Tovar C, Chen S, Knezevic D, Zhao X, Sun H, et al. Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(28):10660–5. Epub 2006/07/05. PMID: [16818887](#)
45. Gamberdinger M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C. Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *Embo J*. 2009; 28(7):889–901. doi: [10.1038/emboj.2009.29](#) PMID: [19229298](#)

46. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* 2005; 171(4):603–14. Epub 2005/11/16. PMID: [16286508](#)
47. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell.* 2007; 131(6):1149–63. Epub 2007/12/18. PMID: [18083104](#)
48. Korolchuk VI, Mansilla A, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates. *Mol Cell.* 2009; 33(4):517–27. Epub 2009/03/03. doi: [10.1016/j.molcel.2009.01.021](#) PMID: [19250912](#)
49. Rogov V, Dotsch V, Johansen T, Kirkin V. Interactions between autophagy receptors and ubiquitin-like proteins form the molecular basis for selective autophagy. *Mol Cell.* 2014; 53(2):167–78. Epub 2014/01/28. doi: [10.1016/j.molcel.2013.12.014](#) PMID: [24462201](#)
50. Linares JF, Amanchy R, Greis K, Diaz-Meco MT, Moscat J. Phosphorylation of p62 by cdk1 controls the timely transit of cells through mitosis and tumor cell proliferation. *Mol Cell Biol.* 2011; 31(1):105–17. Epub 2010/10/27. doi: [10.1128/MCB.00620-10](#) PMID: [20974803](#)
51. Yan J, Seibenhener ML, Calderilla-Barbosa L, Diaz-Meco MT, Moscat J, Jiang J, et al. SQSTM1/p62 interacts with HDAC6 and regulates deacetylase activity. *PloS one.* 2013; 8(9):e76016. Epub 2013/10/03. doi: [10.1371/journal.pone.0076016](#) PMID: [24086678](#)
52. Ulbricht A, Arndt V, Hohfeld J. Chaperone-assisted proteostasis is essential for mechanotransduction in mammalian cells. *Communicative & integrative biology.* 2013; 6(4):e24925. Epub 2013/08/30.
53. Stevermann L, Liakopoulos D. Molecular mechanisms in spindle positioning: structures and new concepts. *Curr Opin Cell Biol.* 2012; 24(6):816–24. Epub 2012/11/13. doi: [10.1016/jceb.2012.10.005](#) PMID: [23142476](#)
54. Almonacid M, Terret ME, Verlhac MH. Actin-based spindle positioning: new insights from female gametes. *J Cell Sci.* 2014; 127(Pt 3):477–83. Epub 2014/01/15. doi: [10.1242/jcs.142711](#) PMID: [24413163](#)
55. Lancaster OM, Baum B. Might makes right: Using force to align the mitotic spindle. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(7):736–8. Epub 2011/07/05. doi: [10.1038/ncb0711-736](#) PMID: [21725285](#)
56. Fink J, Carpi N, Betz T, Betard A, Chebah M, Azioune A, et al. External forces control mitotic spindle positioning. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(7):771–8. Epub 2011/06/15. doi: [10.1038/ncb2269](#) PMID: [21666685](#)
57. Maddox AS, Burridge K. RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J Cell Biol.* 2003; 160(2):255–65. Epub 2003/01/23. PMID: [12538643](#)
58. Kunda P, Pelling AE, Liu T, Baum B. Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. *Curr Biol.* 2008; 18(2):91–101. Epub 2008/01/22. doi: [10.1016/j.cub.2007.12.051](#) PMID: [18207738](#)
59. Cramer LP, Mitchison TJ. Myosin is involved in postmitotic cell spreading. *J Cell Biol.* 1995; 131(1):179–89. Epub 1995/10/01. PMID: [7559774](#)
60. Pasternack MS, Eisen HN. A novel serine esterase expressed by cytotoxic T lymphocytes. *Nature.* 1985; 314(6013):743–5. Epub 1985/04/01. PMID: [3873011](#)
61. Larson SM, Lee HJ, Hung PH, Matthews LM, Robinson DN, Evans JP. Cortical mechanics and meiosis II completion in mammalian oocytes are mediated by myosin-II and Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) proteins. *Mol Biol Cell.* 2010; 21(18):3182–92. Epub 2010/07/28. doi: [10.1091/mbc.E10-01-0066](#) PMID: [20660156](#)
62. Ulbricht A, Hohfeld J. Tension-induced autophagy: may the chaperone be with you. *Autophagy.* 2013; 9(6):920–2. Epub 2013/03/23. doi: [10.4161/auto.24213](#) PMID: [23518596](#)
63. Vos MJ, Zijlstra MP, Kanon B, van Waarde-Verhagen MA, Brunt ER, Oosterveld-Hut HM, et al. HSPB7 is the most potent polyQ aggregation suppressor within the HSPB family of molecular chaperones. *Human molecular genetics.* 2010; 19(23):4677–93. Epub 2010/09/17. doi: [10.1093/hmg/ddq398](#) PMID: [20843828](#)
64. During RL, Gibson BG, Li W, Bishai EA, Sidhu GS, Landry J, et al. Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation. *Embo J.* 2007; 26(9):2240–50. Epub 2007/04/21. PMID: [17446863](#)
65. Werner A, Disanza A, Reifenberger N, Habeck G, Becker J, Calabrese M, et al. SCFFbxw5 mediates transient degradation of actin remodeller Eps8 to allow proper mitotic progression. *Nat Cell Biol.* 2013; 15(2):179–88. Epub 2013/01/15. doi: [10.1038/ncb2661](#) PMID: [23314863](#)
66. Eskelinen EL, Prescott AR, Cooper J, Brachmann SM, Wang L, Tang X, et al. Inhibition of autophagy in mitotic animal cells. *Traffic.* 2002; 3(12):878–93. Epub 2002/11/28. PMID: [12453151](#)

67. Furuya T, Kim M, Lipinski M, Li J, Kim D, Lu T, et al. Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Mol Cell*. 2010; 38(4):500–11. Epub 2010/06/02. doi: [10.1016/j.molcel.2010.05.009](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.009) PMID: [20513426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20513426/)
68. Nakayama Y, Matsui Y, Takeda Y, Okamoto M, Abe K, Fukumoto Y, et al. c-Src but not Fyn promotes proper spindle orientation in early prometaphase. *J Biol Chem*. 2012; 287(30):24905–15. Epub 2012/06/13. doi: [10.1074/jbc.M112.341578](https://doi.org/10.1074/jbc.M112.341578) PMID: [22689581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22689581/)
69. Brunton VG, Frame MC. Src and focal adhesion kinase as therapeutic targets in cancer. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8(4):427–32. Epub 2008/07/16. doi: [10.1016/j.coph.2008.06.012](https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.06.012) PMID: [18625340](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18625340/)
70. Rea SL, Walsh JP, Layfield R, Ratajczak T, Xu J. New insights into the role of sequestosome 1/p62 mutant proteins in the pathogenesis of Paget's disease of bone. *Endocrine reviews*. 2013; 34(4):501–24. Epub 2013/04/25. doi: [10.1210/er.2012-1034](https://doi.org/10.1210/er.2012-1034) PMID: [23612225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23612225/)
71. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62: a versatile multitasker takes on cancer. *Trends Biochem Sci*. 2012; 37(6):230–6. Epub 2012/03/20. doi: [10.1016/j.tibs.2012.02.008](https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.02.008) PMID: [22424619](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22424619/)
72. Yan J. Interplay between HDAC6 and its interacting partners: essential roles in the aggresome-autophagy pathway and neurodegenerative diseases. *DNA and cell biology*. 2014; 33(9):567–80. Epub 2014/06/17. doi: [10.1089/dna.2013.2300](https://doi.org/10.1089/dna.2013.2300) PMID: [24932665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24932665/)
73. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, et al. HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell*. 2007; 27(2):197–213. Epub 2007/07/24. PMID: [17643370](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17643370/)
74. Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, et al. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J*. 2003; 22(5):1168–79. Epub 2003/02/28. PMID: [12606581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12606581/)
75. Sandilands E, Cans C, Fincham VJ, Brunton VG, Mellor H, Prendergast GC, et al. RhoB and actin polymerization coordinate Src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev Cell*. 2004; 7(6):855–69. PMID: [15572128](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15572128/)
76. Landry MC, Champagne C, Boulanger MC, Jette A, Fuchs M, Dziengelowski C, et al. A Functional Interplay between the Small GTPase Rab11a and Mitochondria-shaping Proteins Regulates Mitochondrial Positioning and Polarization of the Actin Cytoskeleton Downstream of Src Family Kinases. *J Biol Chem*. 2014; 289(4):2230–49. Epub 2013/12/05. doi: [10.1074/jbc.M113.516351](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.516351) PMID: [24302731](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24302731/)
77. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977; 36(1):59–74. PMID: [886304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/886304/)
78. Jones HW Jr., McKusick VA, Harper PS, Wu KD. George Otto Gey. (1899–1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol*. 1971; 38(6):945–9.
79. Shi Q, King RW. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. *Nature*. 2005; 437(7061):1038–42. Epub 2005/10/14. PMID: [16222248](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16222248/)
80. Klebig C, Korinth D, Meraldi P, Bub1 regulates chromosome segregation in a kinetochore-independent manner. *J Cell Biol*. 2009; 185(5):841–58. Epub 2009/06/03. doi: [10.1083/jcb.200902128](https://doi.org/10.1083/jcb.200902128) PMID: [19487456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19487456/)
81. Jakobsen L, Schroder JM, Larsen KM, Lundberg E, Andersen JS. Centrosome isolation and analysis by mass spectrometry-based proteomics. *Methods Enzymol*. 2013; 525:371–93. Epub 2013/03/26. doi: [10.1016/B978-0-12-397944-5.00018-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397944-5.00018-3) PMID: [23522479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23522479/)
82. Champagne C, Landry MC, Gingras MC, Lavoie JN. Activation of adenovirus type 2 early region 4 ORF4 cytoplasmic death function by direct binding to Src kinase domain. *J Biol Chem*. 2004; 279(24):25905–15. PMID: [15070897](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15070897/)
83. Lavoie JN, Champagne C, Gingras MC, Robert A. Adenovirus E4 open reading frame 4-induced apoptosis involves dysregulation of src family kinases. *J Cell Biol*. 2000; 150(5):1037–56. PMID: [10973994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10973994/)

Annexe 2: Le complexe chaperon BAG3-HSPB8 influence l'activation de la kinase CDK1 en mitose.

Dans le chapitre 4, nous avons montré que l'association de BAG3 à HDAC6 et son substrat cortactine varie pendant le cycle cellulaire. De plus, nous avons découvert que BAG3-HSPB8 module l'activité de HDAC6 pendant la mitose (chapitre 4). Puisque CDK1 est également une enzyme dont l'association à BAG3 est stimulée pendant la mitose, tout comme l'interaction avec deux de ses cibles p62 et filamine A, nous avons émis l'hypothèse que potentiellement, comme observé pour HDAC6, BAG3-HSPB8 pourrait moduler l'activité de CDK1.

Dans cette annexe, nous présenterons des résultats qui indiquent que l'association de BAG3 avec CDK1 et son substrat filamine A est modulée de manière dépendante du cycle cellulaire (fig. A2.1). Nous montrerons aussi qu'une inhibition partielle de l'activité de CDK1 induit des défauts mitotiques similaires à ceux observés suivant la déplétion de BAG3 (fig. 2A.2 à 4). Nous avons également obtenu des évidences préliminaires qui suggèrent que BAG3 et HSPB8 semble influencer la phosphorylation inhibitrice de la kinase (fig. A2.4). Ensemble, ces observations suggèrent que le complexe BAG3-HSPB8 pourrait partiellement influencer l'activité de la kinase mitotique majeure CDK1, en ligne avec les résultats obtenus concernant une modulation de l'activité de la déacétylase HDAC6.

1. L'association de BAG3 avec CDK1 et son substrat filamine A est modulée par le cycle cellulaire.

Nous avons commencé par analyser si une différence d'interaction entre BAG3, CDK1 et filamine A serait observable par des essais de co-immunoprécipitations. Les extraits protéiques provenant des IP qui ont permis l'analyse des interacteurs dans le chapitre 4 ont été analysés ici pour obtenir les résultats présentés ci-après.

Nous avons observé que CDK1 a co-précipité plus fortement avec BAG3-GFP_WT en G2/M que pendant la mitose (fig. A2.1). Alors que l'interaction préférentielle de BAG3 et CDK1 en mitose est dépendante des motifs IPV et du domaine PxxP, nous n'avons pas remarqué de différence d'association notable avec les mutants BAG3-GFP_IPV ou Δ PxxP pendant la phase G2/M par rapport à l'interaction avec BAG3-GFP_WT (fig. A2.1). Ce résultat indique que l'augmentation d'interaction entre BAG3 et CDK1 serait initiée dès la G2/M, mais ne dépendrait pas, à cette phase,

de l'association à HSPB8 et au domaine PxxP de BAG3. Ces résultats indiquent que le patron d'association entre BAG3 et la kinase CDK1 et la déacétylase HDAC6 est similaire.

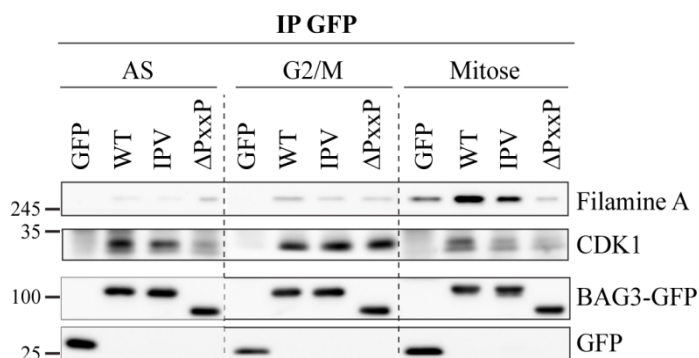


Figure A2.1 : L'association de BAG3 avec CDK1 et son substrat filamine A est modulée de façon différentielle pendant la phase G2/M et la mitose. Des cellules HeLa-RFP-H2B synchronisées en G2/M (RO3306 ; 8 μ M, 18h) ou en mitose (nocodazole ; 200 ng/ml, 16h) ont été infectées avec des adénovirus recombinants conduisant l'expression de GFP ou des protéines BAG3-GFP suivant la déplétion sur 48 h de BAG3 endogène par un siARN spécifique (siBAG3#3). WB montrant les immunoprécipitations de BAG3-GFP_WT ou mutants IPV et Δ PxxP dans des extraits cellulaires asynchrones (AS), en G2/M ou en mitose. Les extraits cellulaires mitotiques ont été préparés à partir des cellules en mitose récupérées par agitation mécanique. Les immunoprécipitations ont été réalisées en utilisant un anticorps anti-GFP. Les analyses en WB à partir des immunoprécipitations obtenues ont été effectuées avec les anticorps indiqués.

Ensuite nous avons analysé le profil d'association de BAG3 avec filamine A. La figure A2.1 montre que, comme attendu, filamine A s'est associée plus fortement à BAG3-GFP_WT pendant la mitose par rapport aux extraits cellulaires asynchrones. Les deux mutants de BAG3, IPV et Δ PxxP, ont présenté une diminution de l'association avec filamine A, qui est cependant nettement plus marquée avec le mutant Δ PxxP (fig. A2.1). Ces résultats suggèrent que l'association de BAG3 avec filamine A requiert la liaison du co-chaperon avec HSPB8 et le domaine PxxP. Nous avons également constaté une augmentation d'association, bien que discrète, entre BAG3-GFP_WT et filamine A pendant la phase G2/M comparativement aux extraits cellulaires asynchrones (fig. A2.1). L'effet des mutants BAG3-GFP_IPV ou Δ PxxP est plus difficile à déterminer pendant cette phase, mais il semble que ces derniers n'interfèrent pas avec l'association par rapport à l'interaction avec BAG3-GFP_WT, puisque l'association à filamine A semble inchangée dans les différentes conditions (fig. A2.1). Ensemble ces résultats suggèrent donc l'apparition d'une association entre BAG3 et filamine A pendant la phase G2/M et qui semble indépendante de la liaison à HSPB8 et au domaine PxxP.

En conclusion, ces expériences ont montré une similitude des profils d'association de CDK1 et filamine A avec BAG3, où une augmentation de ces interactions est observable en G2/M de manière indépendante des motifs IPV et domaine PxxP de BAG3 tandis que ceux-ci deviennent

importants pour l'association mitotique avec ces protéines. Ceci laisse possiblement sous-entendre que la liaison de CDK1 à BAG3 pourrait dépendre de filamine A, ou réciproquement, que la liaison de CDK1 à BAG3 pourrait favoriser l'association avec filamine A.

2. La déplétion de BAG3 et l'inhibition partielle de CDK1 interfère avec la progression mitotique et l'arrondissement des cellules pendant la mitose.

Il est à noter que l'étude de l'activité de CDK1 pendant la mitose par l'utilisation de méthodes classiques comme sa déplétion avec des siARN ou des inhibiteurs n'est pas possible puisque l'activité de la kinase est essentielle pour initier l'entrée des cellules en mitose. Pour rappel, c'est pourquoi le RO3306 est d'ailleurs utilisé pour bloquer la transition G2/M. Par contre, de manière intéressante pour nos travaux, une étude a démontré que l'utilisation de cette drogue à faible dose conduit à une inhibition partielle de l'activité de CDK1 qui ne bloque pas l'entrée des cellules en mitose (McCloy et al. 2014). En revanche cette inhibition partielle induit des défauts mitotiques tels que des défauts de positionnement du fuseau mitotique et d'alignement des chromosomes ainsi qu'un délai dans la progression des cellules en mitose, avec une augmentation du temps passer en mitose (McCloy et al. 2014). Or, ces phénotypes sont également induits par la déplétion de BAG3 ou de HSPB8 (chapitres 2 à 4 ; Fuchs et al, 2015).

Ainsi, dans le but d'évaluer si CDK1 et le complexe chaperon sont impliqués dans la même voie signalétique ou dans des voies qui agissent en parallèle, nous avons procédé à une analyse comparative de l'effet de l'inhibition partielle de CDK1, de la déplétion de BAG3 et de la combinaison des deux sur différents défauts mitotiques. Pour ce faire, des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose par la méthode du double thymidine, déplétées en BAG3 et traitées ou non avec une faible dose de RO3306 (1 μ M), puis fixées pour analyser différents phénotypes par immunofluorescence (fig. A2.2A).

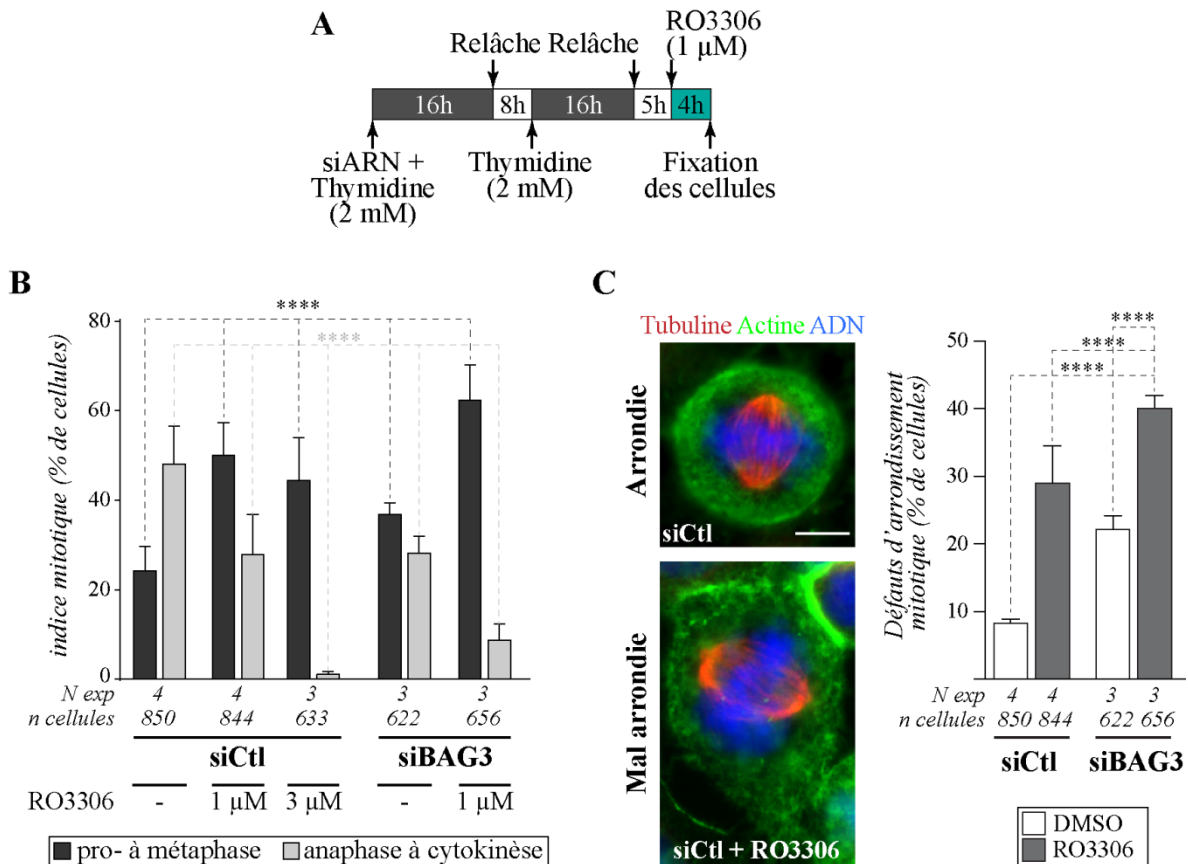


Figure A2.2 : La déplétion de BAG3 et l'inhibition partielle de CDK1 conduisent à un retard de la progression mitotique et induisent des défauts d'arrondissement mitotique. (A) Des cellules HeLa-RFP-H2B ont été synchronisées en mitose par un double blocage à la thymidine et transfectées avec un siCtl ou un siBAG3 (siBAG3#2, déplétion sur 48 h). Durant les 4 dernières heures de la seconde relâche les cellules ont été traitées avec du RO3306 (1 ou 3 μM) ou du DMSO avant d'être fixées. Les cellules ont été traitées pour IF avec un anticorps anti- α -tubuline (fuseau mitotique), phalloïdine (F-actine) et Hoechst (ADN). (B) Histogramme représentant le pourcentage de cellules dans les différentes phases de la mitose dans les cellules contrôles ou déplétées en BAG3 en présence ou non de RO3306 (1 ou 3 μM, 4h). Les résultats +/- SEM sont représentatifs de 3 à 4 expériences indépendantes où 622 à 850 cellules ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher et concernant la catégorie prophase à métaphase: ****, $p < 0,0001$ compare la condition siCtl+DMSO aux conditions siCtl+RO3306 1 μM et 3 μM, siBAG3+DMSO et siBAG3+1 μM RO3306; concernant la catégorie anaphase à cytokinèse: ****, $p < 0,0001$ compare la condition siCtl+DMSO aux conditions siCtl+RO3306 1 μM et 3 μM, siBAG3+DMSO et siBAG3+1 μM RO3306. (C) Images d'épifluorescence d'une cellule mitotique ronde typique (siCtl) par rapport à une cellule mitotique présentant un défaut d'arrondissement (mal arrondie, siCtl+RO3306). Histogramme représentant le pourcentage de cellules HeLa-RFP-H2B avec des défauts d'arrondissement mitotique (cellules partiellement ou non arrondies) dans les différentes conditions. Les résultats +/- SEM sont représentatifs de 3 ou 4 expériences indépendantes où 622 à 850 cellules ont été quantifiées. L'analyse statistique a été effectuée par le test exact de Fisher: ****, $p < 0,0001$ compare la condition siCtl+DMSO à la condition siCtl+RO3306, siBAG3+DMSO et siBAG3+RO3306; ****, $p < 0,0001$, compare la condition siCtl+RO3306 à siBAG3+DMSO et siBAG3+RO3306; et ****, $p < 0,0001$, compare la condition siBAG3+DMSO à siCtl+RO3306.

Nous avons tout d'abord examiné l'indice mitotique, c'est-à-dire la proportion de cellules dans chacune des phases de la mitose, dans les différentes conditions afin d'évaluer la progression des cellules en mitose (fig. A2.1). Comme observé dans le chapitre 2 (fig. 2.6B), nous avons observé que le traitement des cellules avec une faible dose de RO3306 a induit une augmentation significative de 2 fois le nombre de cellules de la prophase à la métaphase (50% +/- 7,3% comparé à ~24 +/- 5,4% dans les cellules contrôles traitées au DMSO, fig. A2.2). En revanche, la proportion de cellules de l'anaphase à la cytokinèse a diminué significativement (de ~1,7 fois) dans les cellules traitées au RO3306 (~28 +/- 8,8% comparé à ~48 +/- 8,4% dans les cellules contrôles traitées au DMSO, fig. A2.2). Ce résultat indique que l'inhibition partielle de CDK1 avec une faible dose de RO3306 (1 μ M) provoque un retard de la progression des cellules en mitose. Le traitement des cellules avec 3 μ M de RO3306 a induit surtout une diminution drastique de la proportion de cellules de l'anaphase à la cytokinèse (~1 +/- 0,6% comparé à ~48 +/- 8,4% dans les cellules contrôles traitées au DMSO, fig. A2.2), indiquant qu'une inhibition plus forte de l'activité de CDK1 induit un retard de la progression mitotique plus drastique.

Comme attendu, la déplétion de BAG3 dans les cellules en mitose traitées au DMSO a provoqué également une augmentation significative de 1,5 fois de la proportion des cellules de la prophase à la métaphase (~37% comparé à ~25% dans les cellules contrôles traitées au DMSO, fig. A2.2) et une diminution significative de ~1,7 fois des cellules de l'anaphase à la cytokinèse (~28 +/- 3,8% comparé à ~48 +/- 8,4% dans les cellules contrôles traitées au DMSO, fig. A2.2). Tout comme nous l'avons précédemment montré, ceci révèle que BAG3 induit un retard dans la progression mitotique. Ensemble, ces résultats suggèrent que la déplétion de BAG3 mime l'inhibition partielle de CDK1 avec 1 μ M de RO3306 sur l'indice mitotique.

De manière importante, nous avons observé que l'inhibition partielle de CDK1 à 1 μ M RO3306 combinée à la déplétion de BAG3 a conduit à une augmentation de la proportion des cellules de la prophase à la métaphase (~63% comparé à ~25% dans les cellules contrôles traitées au DMSO, fig. A2.2), mais surtout, a provoqué une diminution drastique (5,5 fois) de la proportion de cellules de l'anaphase à la cytokinèse télophase (~9 +/- 3,6% comparé à ~48 +/- 8,4% dans les cellules contrôles traitées au DMSO, fig. A2.2). Ce phénotype semble être aggravé dans cette condition, étant proche des proportions observées avec les cellules traitées avec 3 μ M de RO3306, où l'inhibition partielle de CDK1 est donc plus forte. Ceci suggère que la déplétion semble potentialiser l'inhibition partielle de CDK1 et donc que BAG3 et CDK1 pourraient potentiellement agir dans la même voie de signalisation.

Une étude suggère que la déplétion de la RhoGEF Ect2, qui est un substrat de CDK1 pendant la mitose, induit des défauts d'arrondissement mitotique tout comme la déplétion de BAG3 (Matthews et al. 2012). Nous avons donc évalué la proportion de cellules arrondies pendant la mitose versus la proportion de cellules partiellement ou non arrondies dans des conditions d'inhibition partielle de CDK1 et de déplétion de BAG3 (fig. A2.3). Suivant le même protocole expérimental que pour l'analyse de l'indice mitotique, nous avons observé que le traitement avec une faible dose de RO3306 (1 μ M) des cellules transfectées avec le siCtl a conduit à une augmentation significative de la proportion de cellules avec des défauts d'arrondissement mitotique ($\sim 29 \pm 5,5\%$ comparé aux cellules contrôles traitées au DMSO qui présentent $\sim 8 \pm 0,6\%$ de défauts, fig. A2.3). Ce résultat indique que l'inhibition partielle de CDK1 interfère avec les processus conduisant à l'arrondissement mitotique. Comme attendu (Fuchs et al. 2015 ; chapitre 2 à 4), la déplétion de BAG3 a interféré avec l'arrondissement mitotique (augmentation significative du pourcentage de cellules avec des défauts d'arrondissement mitotique en réponse à la déplétion de BAG3, $\sim 22 \pm 2\%$ de défauts, fig. A2.3). Ainsi, il apparaît que la déplétion de BAG3 mime l'inhibition partielle de CDK1 sur les défauts d'arrondissement mitotique.

De façon remarquable, nos résultats ont montré que le traitement des cellules déplétées en BAG3 avec 1 μ M de RO3306 a conduit à une augmentation significative de presque 5 fois de la proportion de cellules présentant des défauts d'arrondissement mitotique ($\sim 40 \pm 2\%$ de défauts d'arrondissement, fig. A2.3). De plus, il est important de noter une augmentation significative de 1,8 fois de défauts d'arrondissement dans les cellules déplétées en BAG3 et traitées au RO3306 comparés aux cellules déplétées en BAG3 et traitées au DMSO ($\sim 40 \pm 2\%$ et $\sim 22 \pm 2\%$ de défauts respectivement, fig. A2.3). Ce résultat suggère donc que l'inhibition partielle de CDK1 aggrave les défauts d'arrondissement mitotique observés en réponse à la déplétion de BAG3.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que la déplétion de BAG3 et l'inhibition partielle de CDK1 induisent des phénotypes similaires, c'est-à-dire des délais de la progression des cellules en mitose ou des défauts d'arrondissement. De plus, nos observations tendent à montrer une aggravation des phénotypes dans les cellules dépourvues de BAG3 et dont l'activité de CDK1 est diminuée. Ceci suggère que les deux protéines pourraient potentiellement agir dans la même voie de signalisation corrélant avec l'hypothèse que nous avons émise selon laquelle BAG3-HSPB8 pourrait moduler l'activité mitotique de CDK1. En effet, la déplétion de BAG3 semble potentialiser l'effet de l'inhibition partielle de CDK1.

3. La déplétion de BAG3 ou de HSPB8 interfère avec le niveau de phosphorylation inhibitrice sur le résidu Y15 de CDK1.

L'activation de CDK1 en G2/M est effectuée grâce à la phosphatase cdc25 qui déphosphoryle deux résidus inhibiteurs dans la poche catalytique de CDK1, la T14 et la Y15 (Strausfeld et al. 1991; Timofeev et al. 2010). Il est donc possible d'évaluer le niveau d'activation de CDK1 par le suivi de la phosphorylation sur un de ces deux résidus. Dans notre analyse, nous utiliserons un anticorps dirigé contre le résidu Y15 phosphorylé.

Afin d'évaluer si le complexe BAG3-HSPB8 est capable de moduler l'état d'activation de CDK1, l'intensité du signal pY15-CDK1 a été évaluée par immunobuvardages à partir d'extraits de cellules HeLa-RFP-H2B mitotiques suivant la déplétion de BAG3 ou HSPB8. Un ratio du signal pY15-CDK1 sur le signal CDK1 total a été réalisé pour évaluer les variations de l'activation de CDK1.

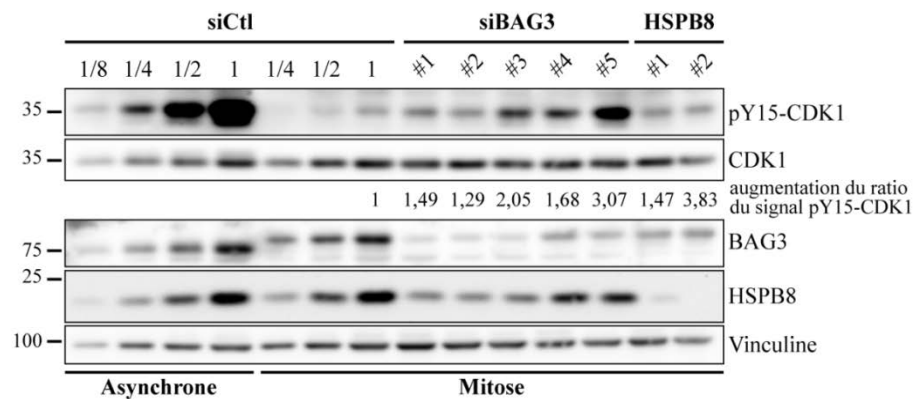


Figure A2.5 : La déplétion de BAG3 ou HSPB8 interfère avec le niveau de phosphorylation inhibitrice sur le résidu Y15 de CDK1. Immunobuvardage montrant l'augmentation du signal phospho-Y15 de CDK1 dans les cellules mitotiques déplétées en BAG3 ou HSPB8. Des cellules HeLa-RFP-H2B asynchrones et synchronisées en mitose par traitement au nocodazole (200 ng/ml, 16 h) ont été transfectées (48 h) avec un siCtl, des siBAG3 ou des siHSPB8. Les cellules mitotiques ont été récupérées par agitation mécanique. Les WB ont été réalisés en utilisant des anticorps anti-phospho-Y15 CDK1 (pY15-CDK1), un anti-CDK1 totale (CDK1), un anti-BAG3, un anti-HSPB8 ; vinculine: contrôle de dépôt. La déplétion de BAG3 et de HSPB8 a été estimée à plus de 75 % après 48 h de transfection par le dépôt de quantités décroissantes d'extraits protéiques contrôles (siCtl). Résultats représentatifs de 2 expériences.

Nous avons constaté une forte détection de la phosphorylation sur le résidu Y15 de CDK1 (pY15-CDK1) dans les cellules asynchrones qui a été drastiquement diminuée (presque de perte du signal 90%) dans les cellules mitotiques (fig. A2.5). Ce résultat montre que la phosphorylation sur Y15 de CDK1 est majoritaire dans les cellules asynchrones corroborant avec son état inactif. Une augmentation du signal pY15-CDK1 a été notée que ce soit suivant la déplétion de BAG3 ou de HSPB8 (environ 2,5 fois en moyenne et respectivement pour chacune des protéines) dans les

extraits cellulaires mitotiques (fig. A2.5). Ce résultat indique que CDK1 est phosphorylée plus fortement sur le site Y15 dans les cellules déplétées en BAG3 et HSPB8 pendant la mitose. De manière importante, ceci suggère que le complexe BAG3-HSPB8 pourrait contribuer à l'activation de CDK1 pendant la mitose.

Les résultats présentés dans cette annexe suggèrent donc que le complexe BAG3-HSPB8 pourrait influencer l'activation de CDK1, tout comme le complexe module l'activité de HDAC6. Ceci pourrait expliquer le mimisme du phénotype entre une déplétion de BAG3 et l'inactivation partielle de CDK1, mais aussi l'aggravation des phénotypes. En effet, nous pouvons supputer que si la déplétion de BAG3 ou HSPB8 a pour conséquence d'interférer avec l'activation de CDK1, il serait alors logique qu'une inhibition partielle induite par le RO3306 combinée à l'inhibition partielle due à la déplétion de BAG3 ou HSPB8 engendre des phénotypes plus accentués. Il serait intéressant d'exprimer une protéine CDK1 constitutivement active dans des cellules déplétées en BAG3 ou HSPB8 et évaluer une potentielle restauration des phénotypes induits par l'absence d'un des membres du complexe.