



Etude du "centralspindlin complex", un élément régulateur de la cytokinèse.

Charles Calmettes

► **To cite this version:**

Charles Calmettes. Etude du "centralspindlin complex", un élément régulateur de la cytokinèse.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. <tel-00341265>

HAL Id: tel-00341265

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00341265>

Submitted on 24 Nov 2008

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

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

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER-GRENOBLE I
ÉCOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THÈSE

Présentée par :

Charles CALMETTES

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Spécialité : Chimie-Biologie

**ÉTUDE DU « CENTRALSPINDLIN COMPLEX », UN ELEMENT
REGULATEUR ESSENTIEL DE LA CYTOKINÈSE**

Date de soutenance : 17 Décembre 2008

Présenté devant la commission d'examen composée de :

Wim Burmeister

David D. Hackney

Claude Prigent

Dimitrios Skoufias

Frank Kozielski

Thèse préparée au Laboratoire des Moteurs Moléculaires
De l'Institut de Biologie Structurale Jean-pierre Ebel (CEA/CNRS/UJF), Grenoble
Sous la direction du Dr. Frank Kozielski

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé à l'Institut de Biologie Structurale et constitue l'accomplissement de plusieurs années d'une intense activité. J'adresse tous mes remerciements à Frank Kozielski qui m'a accueilli dans son laboratoire et encadré durant cette thèse. Merci également à l'ensemble des membres du ex-LMM, Isabelle Garcia-Saez, Salvatore DeBonis, Delphine Blot ainsi que mes compagnons de bureau et de paillasse, Serguey Tcherniuk, Robert Van Lis et Bastien Hermant.

Je remercie également Monsieur David Hackney et Monsieur Claude Prigent pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse, ainsi que Monsieur Wim Burmeister et Monsieur Dimitrios Skoufias pour évaluer mon travail.

Je tiens aussi à adresser ma gratitude au Dr. S. A. Endow pour avoir fourni l'ADN codant de MKLP-1, la kinésine qui a partagé avec moi toute cette aventure. Je remercie également Sandrine Procacci qui a rejoint mes travaux pendant quelques mois comme stagiaire puis technicienne. Un grand merci aussi pour Emmanuelle Neumann pour mes premiers pas sur le microscope électronique. Je ne saurai non plus oublier tous ceux qui ont eu à subir mon incessante présence au sein des différentes plateformes de cristallogénèse, de spectrométrie de masse et de séquençage peptidique.

Merci aux membres du LPC, Dimitrios Skoufias, Susanne Behlke, Françoise Lacroix et Rose-laure Indorato qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire lors de ma dernière année de thèse.

Mes travaux n'auraient pas été réalisés sans le financement du Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie, et l'Association pour la Recherche contre le Cancer.

Ses remerciements ne seraient pas complets si je ne remerciais pas ma famille, mes parents, mon frère et ma soeur qui n'ont jamais cessé de croire en moi.

Enfin je remercie Majida El Bakkouri la femme de ma vie qui me supporte et me soutient depuis 5 ans déjà...

1. Introduction	9
1.1. <u>KINÉSINE ET MICROTUBULE</u>	12
1.1.1. <i>Les microtubules : support des kinésines</i>	12
a. Caractéristiques structurales du microtubule	12
b. Assemblage du microtubule	14
1.1.2. <i>Les kinésines</i>	15
a. Organisation structurale des kinésines	16
b. Diversité structurale	18
c. Cycle catalytique	20
d. Mécanisme du déplacement	21
e. Kinésines et santé	24
1.2. <u>LE CYCLE CELLULAIRE</u>	25
1.2.1. <i>La mitose</i>	26
1.2.2. <i>La cytokinèse</i>	28
a. Le fuseau central	29
b. La voie de signalisation RhoA	31
c. La myosine, force motrice de la cytokinèse	32
d. Assemblage de l'anneau contractile	34
e. Fusion membranaire	34
1.3. <u>FONCTION ET RÉGULATION DU « CENTRALSPINDLIN COMPLEX »</u>	35
1.3.1. <i>Données structurales</i>	35
a. Organisation structurale de la kinésine MKLP-1	35
b. Organisation structurale de MgcRacGAP	37
1.3.2. <i>Rôles cellulaires du « centralspindlin complex »</i>	38
a. Régulation et localisation de MKLP-1	38
b. Régulation et localisation de MgcRacGAP : le complexe MgcRacGAP / ECT2	42
c. Régulation et localisation de MgcRacGAP : Activation de la voie RhoA	45
1.3.3. <i>Le « centralspindlin complex » et la cytokinèse</i>	46
OBJECTIF DES TRAVAUX DE LA THÈSE	47
2. MATERIEL ET MÉTHODE	49
2.1. <u>CLONAGE DE MKLP-1 ET DE MGC RAC GAP</u>	50
2.1.1. <i>Élimination du site NcoI endogène de MKLP-1</i>	50
2.1.2. <i>Synthèse des fragments par PCR</i>	51
2.1.3. <i>Insertion dans un plasmide</i>	51
a. Purification des produits PCR	51
b. Insertion des fragments d'intérêt	53
c. La transformation bactérienne	53
2.1.4. <i>Mutation de la boucle L6 de MKLP-1</i>	54
2.2. <u>SUREXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTÉINES</u>	54
2.2.1. <i>Vecteurs d'expression de type pET</i>	54
2.2.2. <i>Test de surexpression</i>	55
2.2.3. <i>Purification des protéines recombinantes</i>	56
a. Cultures cellulaires et purifications	56
b. Expériences de dénaturation/renaturation	57
2.3. <u>ENZYMLOGIE</u>	58
2.3.1. <i>Dosage de l'activité ATPasique par test couplé</i>	58
2.3.2. <i>Détermination des constantes cinétiques</i>	60
2.3.3. <i>Criblage des chimiothèques</i>	61
2.4. <u>EXPÉRIENCE DE LIAISON AUX MICROTUBULES</u>	62
2.5. <u>ESSAIS DE CRISTALLISATION</u>	63
2.5.1. <i>Principe de la cristallographie</i>	64
2.5.2. <i>Essais de cristallogenèse</i>	65
3. RESULTATS	67
3.1. <u>CARACTÉRISATION DE MKLP-1 ET MGC RAC GAP</u>	68
3.1.1. <i>Les constructions clonées</i>	68
3.1.2. <i>Expressions des fragments de MKLP-1</i>	73
3.1.3. <i>Expression des fragments de MgcRacGAP</i>	75
3.1.4. <i>Historique des essais de cristallogenèse</i>	76
3.1.5. <i>Résultat des expériences de cristallogenèse</i>	77

3.2. <u>CARACTÉRISATION DE LA BOUCLE L6 DE MKLP-1</u>	80
3.2.1. <i>Activité Basale</i>	82
3.2.2. <i>Activité stimulée</i>	84
3.3. <u>CRIBLAGE</u>	87
3.3.1. <i>Intérêt</i>	87
3.3.2. <i>Identification d'inhibiteurs potentiels</i>	89
3.3.3. <i>Détermination des IC₅₀</i>	92
3.3.4. <i>Spécificité</i>	94
3.3.5. <i>Caractérisation de l'inhibiteur 2C2</i>	96
3.4. <u>INTERACTION « CENTRALSPINDLIN COMPLEX » / TUBULINE</u>	99
3.4.1. <i>Historique</i>	99
3.4.2. <i>Interaction du domaine queue avec les microtubules</i>	100
a. <i>Dépendance nucléotidique du complexe « queue »/tubuline</i>	104
b. <i>Effets du sel sur la formation du complexe « queue »/tubuline</i>	106
3.4.3. <i>Interaction MgcRacGAP / microtubule</i>	107
4. DISCUSSION	109
4.1. <u>EXPRESSION ET CRISTALLOGENÈSE DE MKLP-1 ET MGCACGAP</u>	110
4.2. <u>LA BOUCLE L6 DE MKLP-1</u>	111
4.3. <u>L'INHIBITEUR 2C2</u>	113
4.4. <u>MODÈLE DE L'INTERACTION « CENTRALSPINDLIN COMPLEX » / MICROTUBULES</u>	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118

Liste des Abreviation :

2xYT	Yeast Extract Tryptone
Å	Angström
ACES	Acide N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN codant
ADP	Adenosine diphosphate
AMP-PCP	Méthylène-adénosine 5'-triphosphate
AMP-PNP	5' Adenylyl-imidotriphosphate
AS-2	Adociasulfate-2
ATP	Adenosine triphosphate
BET	Bromure d'éthidium
Cdc	Cell division control
Cdk1	Cyclin dependant knase 1
CENP-E	Centromere protein E
CHO	Chinese hamster ovary
DMSO	Dimethyl sulfoxyde
DO	Densité optique
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
EGTA	Acide éthylène-glycol-tetraacétique
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FPLC	Fast protein liquid chromatography
GAP	GTPase activating protein
GEF	Guanine exchange factor
GST	Glutathion S-transferase
GTP	Guanine triphosphate
HRP	horse-radish peroxidase
IBS	Institut de Biologie structurale
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
K _d	Constante de dissociation
kDa	kilo Dalton
KHC	Kinesin heavy chain (Kif5B)

Kif	Kinesin superfamily protein
KLP	Kinesin Like Protein
LB	Lennox broth
LDH	Lactate déshydrogénase
MAP	Microtubule associated protein
MCS	Multiple cloning site
MgcRacGAP	male-germ-cell Rac GTPase-activating protein
MKLP-1	Mitotic Kinesin Like Protein 1
MT	Microtubule
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide
Ncd	Non-claret disjunctional kinesin
NiNTA	Nickel et acide nitrilotriacétique
NLS	Nuclear localization signal
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein data bank
PEP	Phosphoenolpyruvate
P _i	Phosphate inorganique
PIPES	Acide piperazine-N, N' -bis(2-ethanesulfonique)
PK	Pyruvate kinase
Plk1	Polo-like kinase 1
PMSF	Phenyl methyl sulfonyl fluorure
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
rcf	Relative centrifugal force
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TEV	Tabacco etch virus
TBS	Tris buffered saline
Tris	(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultra Violet

Chapitre 1

INTRODUCTION

Les moteurs moléculaires sont des nanomachines biologiques intervenant comme des éléments protéiques essentiels aux mouvements et aux trafics intracellulaires des organismes vivants. Généralement ces moteurs moléculaires sont définis par leurs capacités à fournir un travail mécanique via une consommation d'énergie chimique. Ainsi, de nombreuses enzymes chimiomécaniques puisent leur énergie dans l'hydrolyse de l'ATP ou l'utilisation d'un potentiel électrochimique transmembranaire. Les connaissances accumulées sur les moteurs moléculaires révèlent la participation de ces machines dans de nombreux processus du vivant tels que la contraction musculaire (myosine), la division cellulaire (kinésine), le transport intracellulaire (kinésine, dyneine), la synthèse d'ATP (F₀F₁ ATP synthase), la transcription de l'ADN (polymérase, topoisomerase), le mouvement de flagelle bactérien (moteur rotatoire) ou des cils et flagelles eucaryotes (dyneine), *etc.*

Les kinésines sont des moteurs moléculaires capables de convertir l'énergie chimique de l'ATP en changements conformationnels. Ces modifications structurales induites permettront un déplacement mécanique de la protéine sur un support spécifique aux kinésines : les microtubules (Schliwa et Woehlke, 2003). En raison des rôles variés dans lesquels sont impliqués les kinésines, ces protéines se révèlent essentielles pour de nombreuses fonctions cellulaires telles que le transport intracellulaire, la différenciation des dendrites ou encore la division cellulaire. Conséquemment à l'importance de ces protéines, il a été découvert que certains dysfonctionnements physiologiques étés corrélés à la défaillance de kinésines (Gunawardena et Goldstein, 2004 ; Rietdorf et al., 2001). D'un point de vue médical, la connaissance des rôles joués par ces protéines motrices reste donc déterminante pour le développement de nouvelles perspectives en matière de diagnostic et de thérapie, mais aussi dans notre compréhension de mécanismes cellulaires fondamentaux.

Chez l'homme, 13 kinésines sont dites mitotiques, car intervenant au cours de la mitose (Zhu et al., 2005b). Ces kinésines mitotiques soulèvent un intérêt croissant en raison de leurs implications essentielles au cours de la division cellulaire ; certaines d'entre-elles sont considérées comme des cibles d'intérêt majeur pour lutter contre la prolifération incontrôlée des cellules cancéreuses. Des thérapies anticancéreuses potentielles sont aujourd'hui envisagées avec l'utilisation de molécules inhibitrices adressées contre ces protéines motrices cruciales pour la mitose (Mayer et al., 1999).

Les travaux réalisés au cours de cette thèse aborderont l'étude d'une kinésine mitotique, MKLP-1 (Mitotic Kinesin Like Protein 1), essentielle à l'évolution du cycle cellulaire (Wright et al., 1993). La protéine MKLP-1 est notamment requise dans le mécanisme de séparation des deux cellules filles : la cytokinèse (Zhu et al., 2005a). Elle s'associe *in vivo* avec MgcRacGAP (une protéine activatrice de petites GTPase), sous la forme d'un complexe hétérotétramérique nommé le « centralspindlin complex ». Ce complexe MKLP-1/MgcRacGAP est connu pour être un important élément régulateur de la cytokinèse, permettant notamment l'élaboration du corps intermédiaire, aussi appelé « midbody matrix » ; une structure résultant de l'association robuste et dense de faisceaux de microtubules et de protéines régulatrices de la cytokinèse (Glotzer, 2005).

Les travaux présentés dans cette thèse aborderont l'étude structurale et fonctionnelle de la kinésine mitotique MKLP-1, par le biais d'approches enzymologiques. Un intérêt particulier sera aussi porté sur le rôle du complexe MKLP-1/MgcRacGAP qui agrège les microtubules polaires situés au centre du fuseau central (corps intermédiaire).

1.1. Kinésine et microtubule

1.1.1. Les microtubules : support des kinésines

Les microtubules sont avec les filaments d'actine et les filaments intermédiaires, l'un des éléments majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes (Dustin, 1984). Composé de polymères protéiques hautement dynamiques, le cytosquelette est requis pour le déplacement et le changement de forme des cellules. Il constitue également un support facilitant le trafic intracellulaire utilisant des moteurs moléculaires (kinésines et dynéines) capables de mobilité sur sa surface.

In vivo, l'organisation des microtubules est dépendante de l'état physiologique et du type cellulaire. Les microtubules sont uniquement présents dans les cellules eucaryotes et sont particulièrement abondants dans les cellules nerveuses où ils représentent 10 à 20% des protéines totales. En interphase, les microtubules forment généralement un réseau cytoplasmique rayonnant à partir d'un centre organisateur appelé le centrosome (Karsenti et al., 1984). Lorsque la cellule entre en division, ce réseau sera alors entièrement dépolymérisé pour se ré-assembler en un fuseau mitotique nucléé via deux centrosomes dupliqués à partir du centrosome initial (Hyman et Karsenti, 1996). Pendant la mitose, les microtubules jouent un rôle majeur en interagissant avec les kinétochores des chromosomes et en permettant leur ségrégation de part et d'autre de la plaque équatoriale.

a. Caractéristiques structurales du microtubule

Les microtubules sont des polymères cylindriques creux et rigides de 25 nm de diamètre et d'une longueur variable pouvant dépasser plusieurs centaines de microns. La paroi du microtubule est constituée de plusieurs protofilaments résultant de la polymérisation d'un hétérodimère de tubuline, lui-même composé des deux sous-unités α et β tubuline (**figure 1**). Les protofilaments s'assemblent d'abord latéralement pour former des feuillets se repliant ensuite progressivement sur eux-mêmes afin de former le cylindre protéique. On compte généralement 13 protofilaments par microtubules (Tilney et al., 1973) bien que certains microtubules peuvent être constitués de 11 à 16 protofilaments.

En raison de l'assemblage orienté de briques asymétriques (hétérodimère α et β tubuline), le microtubule acquiert une orientation longitudinale. Cet élément du cytosquelette possède donc une structure polaire, avec une extrémité α tubuline et une extrémité β tubuline, respectivement appelée extrémité - et + du microtubule (Fan et al., 1996 ; Mitchison, 1993). Les deux extrémités du microtubule sont labiles et possèdent chacune des propriétés dynamiques différentes. Cette polarisation est une caractéristique fondamentale permettant en outre de diriger le transport, notamment celui des kinésines dont le sens de marche est spécifiquement dirigé vers l'un des pôles + ou - du microtubule.

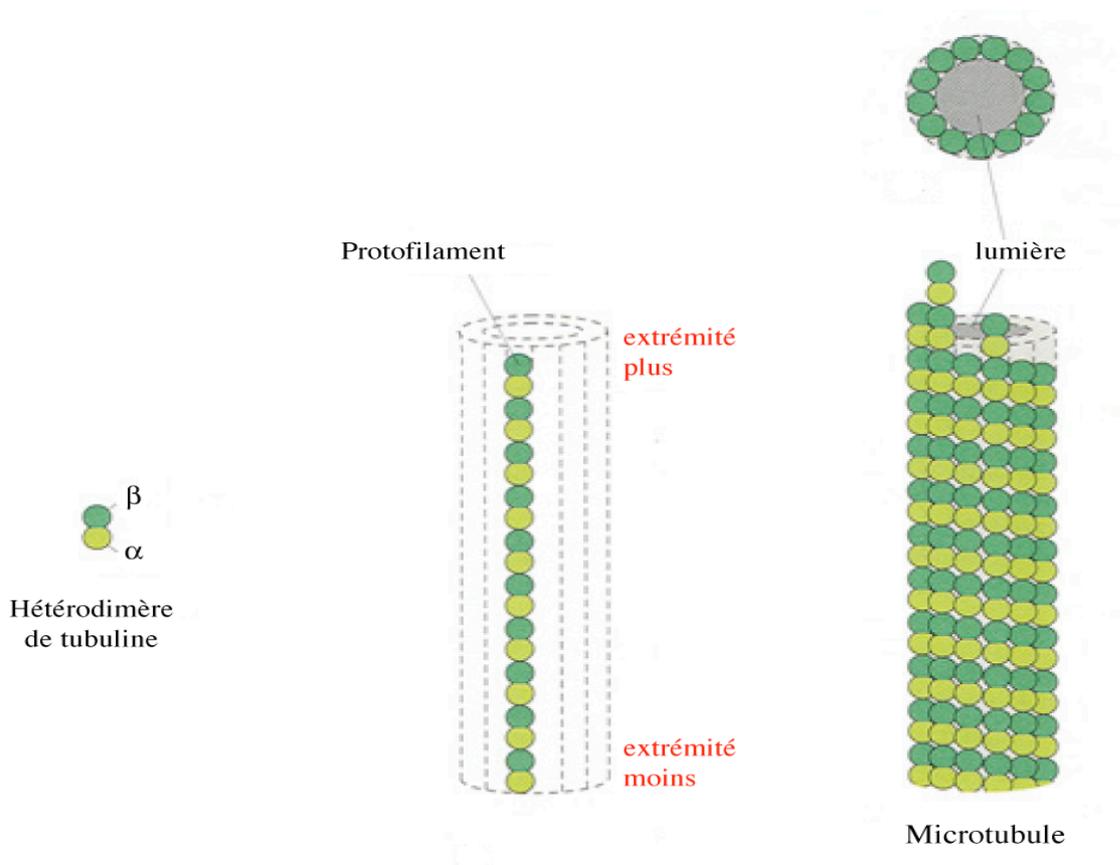


Figure 1 : Les différents niveaux d'organisation de la tubuline. Les hétérodimères de tubulines s'assemblent sur une dimension afin de former les protofilaments qui à leur tour s'associent latéralement pour former un feuillet. Ce feuillet aboutira à l'obtention d'un cylindre creux et rigide en se repliant sur lui-même. La plupart des cellules possèdent des microtubules à 13 protofilaments.

b. Assemblage du microtubule

Chaque sous-unité du dimère de tubuline possède un site de fixation au nucléotide GTP. Le site de la sous-unité α est toujours associé au GTP (site non-échangeable), alors que celui de la sous-unité β peut être lié aussi bien au GTP qu'au GDP (site échangeable). Pour qu'il y ait association, le site échangeable de l'hétérodimère de tubuline doit être occupé par une molécule de GTP, qui sera ensuite hydrolysée au cours de la polymérisation. La formation des polymères de tubuline requiert une concentration minimale en tubuline appelée concentration critique, dont le seuil est modulé par la présence de certains effecteurs ou protéines associées aux microtubules (MAP).

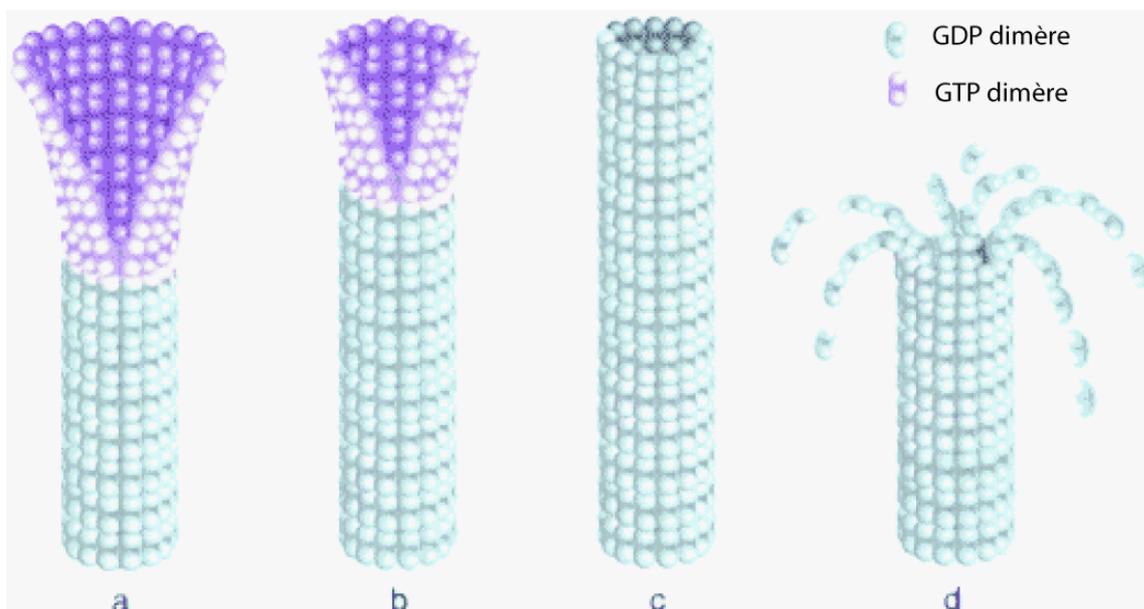


Figure 2 : Instabilité dynamique des microtubules. (a) Au cours de l'assemblage, l'extrémité du microtubule est stabilisée par des dimères de tubuline-GTP (en violet). Cette structure forme une coiffe stabilisatrice. (b) Les protofilaments en polymérisation (sauvetage) s'agencent alors sous la forme d'un feuillet qui se replie afin de former un tube, tandis que le GTP est hydrolysé en GDP et phosphate inorganique. (c) La disparition par hydrolyse de la coiffe de tubuline-GTP provoque un stress mécanique introduisant une courbure des protofilaments. (d) Il s'ensuit une dépolymérisation rapide du microtubule (catastrophe) qui rentrera à nouveau en période de sauvetage suite à l'assemblage d'une nouvelle coiffe de tubuline-GTP.

Les microtubules se dépolymérisent et se polymérisent continuellement à vitesse variable, on parle d'instabilité dynamique (Heald et Nogales, 2002). Les fréquences de transitions entre les phases de « catastrophe » (dépolymérisation) et de « sauvetage » (polymérisation) sont corrélées à l'état nucléotidique du site échangeable au sein du dimère de tubuline (Carlier et Pantaloni, 1981 ; Hyman et al., 1995). L'état GDP, instable, constitue l'essentiel de la paroi du microtubule qui est alors maintenu par une coiffe stabilisatrice formée de tubuline-GTP localisée à l'extrémité (+) (Janosi et al., 2002). Cette coiffe de tubuline-GTP favorisera l'élongation par addition de nouvelles sous-unités, tandis que l'hydrolyse du GTP et donc la disparition de la coiffe, entraînera une dépolymérisation (**figure 2**). La succession d'étapes de sauvetage et de catastrophe sera donc corrélée à l'assemblage ou à la disparition de cette coiffe. L'extrémité (-) du microtubule ne possède pas de coiffe tubuline-GTP et elle est donc le siège d'une dépolymérisation continue.

Cette instabilité dynamique est une caractéristique essentielle des microtubules, permettant de remanier continuellement le réseau microtubulaire. Des effecteurs permettent cependant d'ajuster localement le comportement de cette dynamique. C'est par exemple le cas de la protéine stabilisatrice MAP-2 (Kim et al., 1979) ou de la protéine déstabilisatrice MCAK (Maney et al., 2001). Certaines drogues sont utilisées pour modifier l'instabilité dynamique des microtubules. C'est par exemple le cas des *taxanes* (taxol, taxotere...) et des *vinca-alcaloïdes* (vinblastine, vincristine...) qui inhibent respectivement, la dépolymérisation et la polymérisation du microtubule. Ces drogues à fort potentiel antimitotique sont couramment employées dans les thérapies anti-cancer. En effet, la dynamique des microtubules est une propriété nécessaire lors de la division cellulaire.

1.1.2. Les kinésines

Les kinésines ont initialement été identifiées en 1985 comme des moteurs moléculaires transportant des organelles membranaires le long d'axones géants de calamar (Lasek et Brady, 1985 ; Vale et al., 1985). Les kinésines ou KLP (Kinesin Like Protein) sont présentes dans tous les organismes eucaryotes, et une quarantaine sont actuellement identifiées chez l'homme. Ces enzymes chimiomécaniques utilisent le principe de transfert de l'énergie chimique de l'hydrolyse d'ATP en énergie mécanique pour créer un déplacement

directionnel de la kinésine le long des microtubules. Ces protéines interviennent dans les transports intracellulaires et la division cellulaire, où elles sont requises pour la motilité de nombreux cargos au sein de la cellule (organelles, mitochondries, vésicules membranaires, protéines et complexes protéiques, chromosomes, virus pathogènes, microtubules...). Elles interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires fondamentales, parmi lesquelles la division cellulaire.

a. Organisation structurale des kinésines

La fonction de transport des cargos *via* les kinésines s'explique par l'organisation structurale de ces protéines. De façon générale, on remarquera que les kinésines sont des protéines multimériques (souvent homodimériques), organisées en quatre domaines distincts (domaine moteur, « cou », « tige » et « queue ») dont l'architecture reste très conservée au sein de cette famille protéique (**figure 3**).

Le domaine moteur : cette région de forme globulaire constitue le noyau catalytique de la kinésine. Il possède un site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'un site de liaison au microtubule. Ce domaine sert d'interface entre la kinésine et le microtubule, et constitue la région la plus conservée en séquence entre les kinésines (20 à 90% d'identité de séquence protéique). Le repliement des têtes motrices est conservé et se structure avec un feuillet β central cerné par 6 hélices α (3 de chaque côté du feuillet β) ; cette organisation est proche de celle observée chez les myosines ou chez certaines petites protéines G (Kull et al., 1999).

Le domaine de connexion ou « cou » : Cette région-charnière est généralement courte (une dizaine de résidus). Elle se situe entre le domaine moteur et le domaine de dimérisation qui le succède. Le « cou » interagit avec le domaine catalytique pour amplifier le déplacement de la tête motrice lors du processus de marche.

Le domaine de dimérisation ou « tige » : cette région se replie en une longue hélice α s'organisant en un enroulement super-hélice *via* la dimérisation de deux chaînes de kinésines associées par ce même domaine.

Le domaine d'interaction au cargo ou « queue » : ce domaine se situe à l'extrémité opposée du domaine moteur et sert à recruter la cible à transporter. Le repliement de la queue reste ambigu, et il est très peu probable qu'il soit conservé parmi les kinésines ; cela en raison

d'une très forte divergence de séquence entre les domaines « queue » référencés, mais aussi en raison des différents types de cargos transportés spécifiquement selon les kinésines.

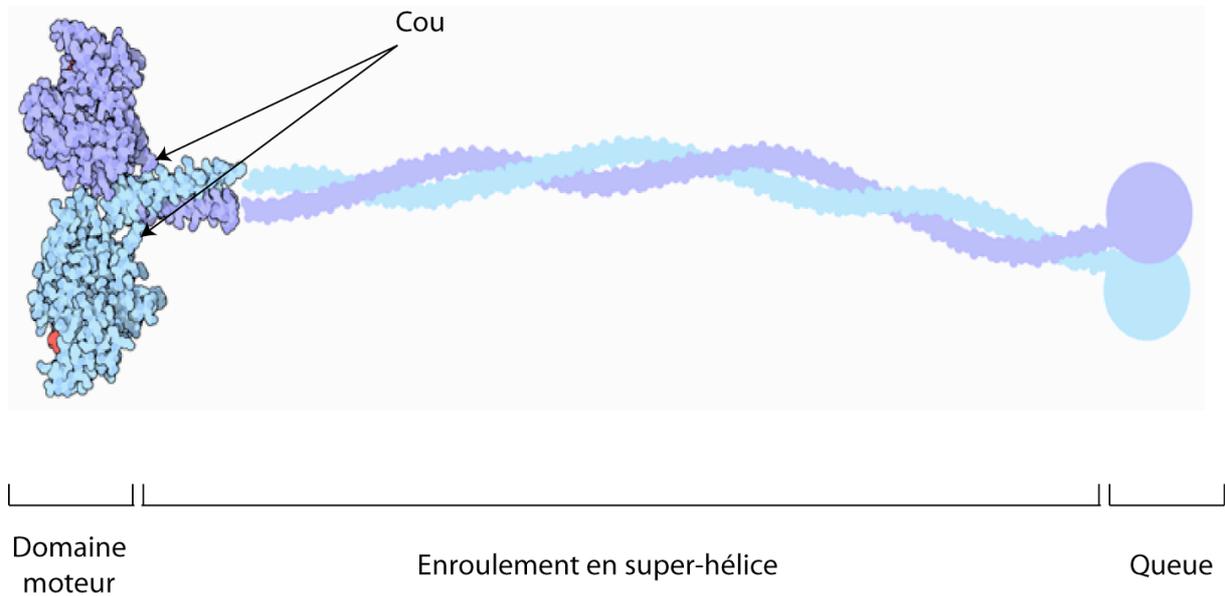


Figure 3 : Schéma d'un homodimère de chaînes lourdes de la kinésine conventionnelle (Kif5B). Les kinésines sont généralement constituées de quatre domaines conservés au sein de cette famille protéique. Elles contiennent un domaine moteur capable de « marcher » sur les microtubules et d'hydrolyser l'ATP. Cette tête motrice est reliée à un domaine de dimérisation en enroulement super-hélice *via* une courte séquence de quelques résidus appelé le « cou ». Sur l'autre extrémité, la kinésine possède un domaine « queue », globulaire, intervenant généralement pour la fixation du cargo à transporter.

b. Diversité structurale

Les KLP sont classifiés en sous-familles rendant compte de leur diversité structurale (**figure 4**). Si les kinésines sont essentiellement homodimériques, certains de ces moteurs moléculaires, dont la kinésine conventionnelle (Kif5B), s'associent avec des chaînes légères additionnelles sous la forme d'hétérotétramères (Kamal et al., 2001). De même, il a été observé des kinésines dites bipolaires s'assemblant en homotétramère ; c'est par exemple le cas de la protéine Eg5, capable de faire coulisser deux microtubules sur lesquels elle marche simultanément (Sharp et al., 2000). Par ailleurs, les cas les plus surprenants viennent de kinésines monomériques comme Kif1A (Bloom, 2001) ; ou de MCAK, une kinésine qui dépolymérise les extrémités des microtubules (Helenius et al., 2006).

Riches d'un large panel oligomérique, les kinésines se différencient également par un sens de marche spécifique, dirigé vers l'extrémité + ou - des microtubules. Il a été identifié des kinésines possédant leurs domaines moteurs sur l'extrémité N-terminale (70% des kinésines) tandis que d'autres présentent leurs domaines moteurs à l'extrémité C-terminales (20%) ou encore dans un domaine moteur central (10%) (Aizawa et al., 1992 ; Yang et al., 1989). Reflétant ses différences, les kinésines sont classifiées en 14 sous-familles rendant compte de leurs particularités structurales sur la base de l'homologie de séquences des domaines moteurs (**figure 4**) (Kim et Endow, 2000).

c. Cycle catalytique

Le domaine moteur constitue le noyau catalytique qui fournit l'énergie nécessaire au déplacement sur le microtubule *via* l'hydrolyse de l'ATP. L'utilisation de nucléotides fluorescents ou marqués radioactivement a permis d'établir les principales étapes du cycle d'hydrolyse de l'ATP au sein de la kinésine (Hackney, 1988 ; Hackney et al., 1989) (**figure 5**). En l'absence de microtubules, l'étape limitante de ce cycle correspond au relargage de l'ADP. Néanmoins, la vitesse du relargage de l'ADP peut être modulée pour stimuler l'activité ATPasique. En effet, il a été constaté que la fixation de la kinésine sur les microtubules stimule la libération de l'ADP, ce qui se répercute alors par un emballement de l'activité ATPasique ; on parle alors d'activité stimulée. Cette stimulation permet selon les kinésines, d'augmenter la vitesse de catalyse d'un facteur cent à plusieurs milliers.

Il a été remarqué que le cycle catalytique des deux domaines moteurs adjacents s'influencent l'un l'autre en fonction de leurs états nucléotidiques. On observe alors une coordination de leurs activités ATPasiques, où la fixation de l'ATP sur l'une des deux têtes motrices est corrélée au relargage de l'ADP de l'autre tête motrice (Gilbert et al., 1998).

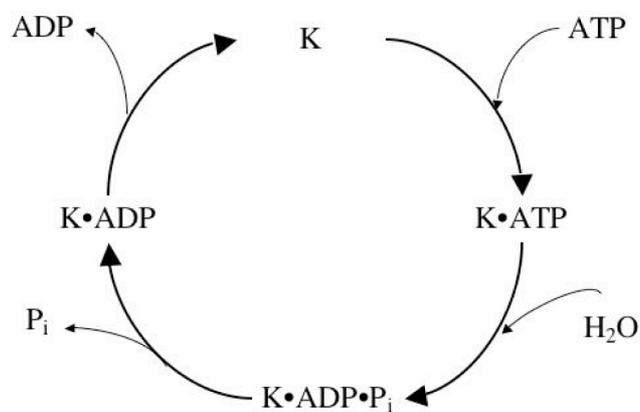


Figure 5 : Cycle d'hydrolyse de l'ATP par les kinésines (K). Le relargage de l'ADP est l'étape limitante de la catalyse. La fixation de la kinésine sur les microtubules facilite l'expulsion de l'ADP et augmente alors sa vitesse d'hydrolyse maximale. L'affinité du domaine moteur pour le microtubule est dépendante de son état nucléotidique. La forme ATP et sans nucléotide sont les conformations les plus affines pour la tubuline ; la forme liée à l'ADP ou l'ADP•Pi sont les moins affines.

d. Mécanisme du déplacement

Des expériences réalisées sur des molécules uniques ont permis de montrer que les kinésines se déplacent sur le microtubule par pas discrets de 8 nm, en interagissant avec la sous-unité β du dimère de tubuline. Chaque pas correspond à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP et la distance parcourue coïncide avec l'espace d'un dimère de tubuline (Coy et al., 1999b). Bien que les mécanismes de déplacement soient encore ambigus, il apparaît que le mouvement de la kinésine implique des changements structuraux au sein du domaine moteur et du « cou » pour engendrer le mécanisme de marche (Schief et Howard, 2001).

Directionnalité :

Les kinésines présentent un sens de marche spécifique, orienté vers l'une des extrémités du microtubule. On dénombre ainsi des sous-familles de kinésine se déplaçant en direction de l'extrémité (+) des microtubules tandis que d'autres s'orientent caractéristiquement vers l'extrémité (-) opposée. Le domaine « cou » joue vraisemblablement un rôle prépondérant dans le sens de ce mouvement (Wade et Kozielski, 2000). Ainsi, lorsque les domaines moteurs de deux kinésines qui vont dans des sens opposés sont échangés, les chimères résultantes acquièrent alors la directionnalité du « cou » conservé (Case et al., 1997 ; Endow, 1999). De façon similaire, l'échange des domaines « cou » entre différentes kinésines, impose aux mutants ainsi créés le sens de déplacement originaire du nouveau « cou » (Endow et Higuchi, 2000). Ces expériences révèlent donc l'importance de cette région intermédiaire entre le domaine moteur et l'enroulement super-hélice dans l'acquisition de la directionnalité (Vale et al., 2000).

Processivité et modèle de déplacement :

Certaines kinésines se déplacent sur les microtubules sur de longues distances, effectuant ainsi de nombreux pas successifs avant de se détacher de son support. On parle dans ce cas de kinésines processives. C'est par exemple le cas de la kinésine conventionnelle (Kif5B), capable de parcourir des distances de l'ordre du micromètre (une centaine de pas) avant de se détacher du microtubule (Block et al., 1990 ; Howard et al., 1989).

L'un des modèles suggérés pour le mode de déplacement des kinésines processives est appelé « hand-over-hand » (Asbury et al., 2003). Il consiste en un mécanisme dans lequel les deux

domaines moteurs interagissent alternativement le long du protofilament (**figure 6**) ; la tête arrière se détacherait pour venir se fixer sur le prochain dimère de tubuline du même protofilament, et créerait ainsi un déplacement de 8 nm du centre de masse (Hancock et Howard, 1998). Les pas alternatifs des deux têtes motrices seraient alors reliés au déphasage de leur cycle ATPasique, de sorte qu'au moins un domaine moteur soit en contact avec le microtubule. Ce modèle s'appuie notamment sur le changement d'affinité du domaine moteur envers la tubuline en fonction de son état nucléotidique. Les états ATP et sans nucléotide correspondent aux formes affines pour le microtubule, tandis que l'état ADP tend vers une forte diminution de l'affinité moteur / microtubule (Crevel et al., 1996).

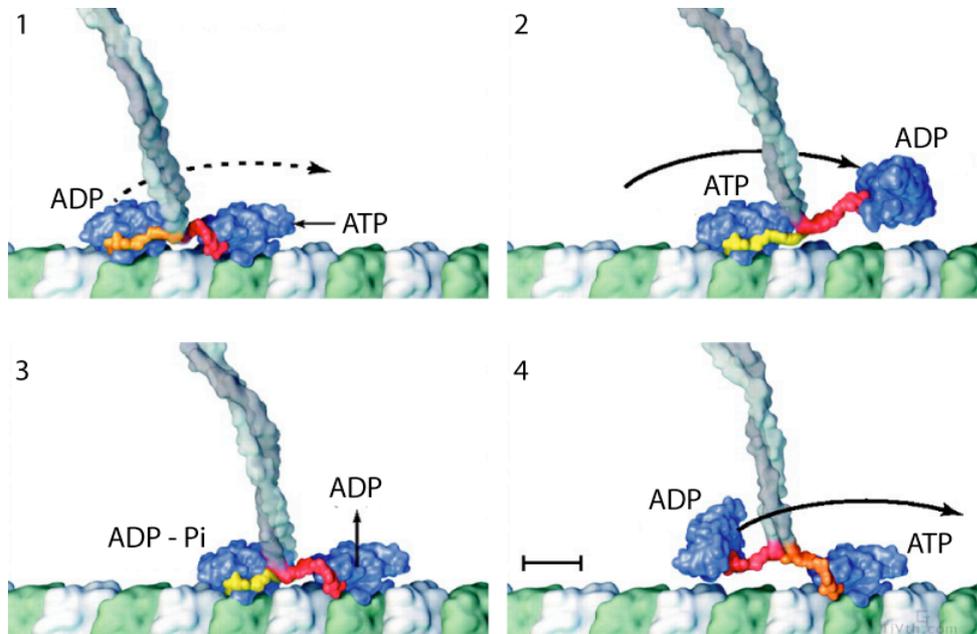


Figure 6 : Modèle « hand-over-hand » pour le mouvement processif des kinésines. Les domaines moteurs (bleu) ont un cycle ATPasique coordonné et décalé. (1) Chaque domaine moteur est relié à un dimère de tubuline (α tubuline en blanc ; β tubuline en vert). La fixation d'un ATP sur la tête meneuse va entraîner le décrochement et le déplacement de l'autre moteur en avant. (2) Le moteur ADP ainsi détaché, cherche par diffusion son site d'interaction avec la β tubuline adjacente. (3) En se fixant sur le microtubule, la nouvelle tête meneuse va relarguer son ADP et l'échanger par un ATP, tandis que l'autre moteur hydrolysera son ATP. (4) Le cycle recommence et la kinésine effectue un mouvement processif. D'après Vale et Milligan (2000).

Cependant ce modèle est controversé, et les couplages entre l'hydrolyse de l'ATP et les changements de conformation restent encore ambigus. De plus, ce modèle n'explique pas le fonctionnement de Kif1A, une kinésine monomérique et pourtant processive (Okada et Hirokawa, 1999). Le modèle « hand-over-hand » ne pouvant pas se transposer dans le cas des kinésines monomériques ou non processives, d'autres mécanismes de déplacement doivent donc exister au sein de cette famille de moteurs moléculaires.

Une autre approche du mouvement considère un système de déplacement et de production de forces, modélisé par des transitions d'états sur une barrière de potentiel unidimensionnel (**figure 7**) (Astumian et Derenyi, 1999). Ce modèle de mouvement connu sous le nom de « Brownian ratchet motion » fait jouer un rôle essentiel à l'énergie thermique et se distingue du modèle « hand-over-hand » car il ne nécessite pas le détachement des têtes motrices, ni ne fait intervenir les changements conformationnels comme forces créatrices du mouvement (Peskin et Oster, 1995).

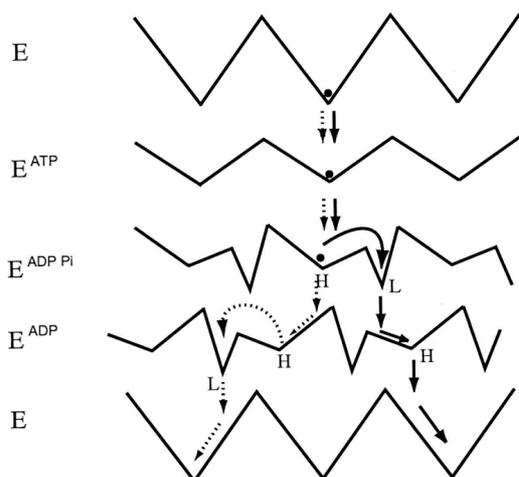


Figure 7 : Schéma du mécanisme du déplacement réversible d'un moteur brownien. Cette théorie considère que le déplacement résulte des transitions d'états sur une barrière de potentiel unidirectionnel évoluant selon le cycle d'hydrolyse de l'ATP. En fonction de l'état nucléotidique du domaine moteur ($E^{\text{nucléotide}}$), la tête motrice va se transloquer sur le microtubule. Selon cette approche, les changements structuraux ne participent pas à la création d'une force mécanique, mais permettent de conduire la diffusion de la kinésine dans une direction privilégiée. D'après Astumian et Derényi (1999).

Contrairement aux moteurs moléculaires processifs, certaines kinésines se révèlent incapables d'effectuer un grand nombre de pas successifs car elles se détachent fréquemment du microtubule (Crevel et al., 1997 ; Stewart et al., 1998). Les deux modes de déplacement processif et non-processif résultent certainement d'une adaptation physiologique pour différentes fonctions cellulaires. La processivité s'applique visiblement à un fonctionnement individuel impliqué dans des déplacements durables et persistants, alors qu'à l'inverse, les kinésines non-processives fonctionnent collectivement et semblent adaptées pour des interventions brèves et rapides (Schliwa et Woehlke, 2003).

e. Kinésines et santé

Les rôles à la fois variés et importants des kinésines dans des fonctions cellulaires essentielles peuvent être à l'origine de dysfonctionnements physiologiques graves en cas de défaillance de l'une d'entre elles. Des études récentes ont ainsi fait le lien entre certaines pathologies humaines et le défaut de kinésines (**tableau 1**)

Tableau 1 : Liste non exhaustive de maladies impliquant un dysfonctionnement de kinésines.

Maladie ou syndrome	Moteurs impliqués	Référence
Maladie de Charcot-Marie-Tooth	Kif1B	(Zhao et al., 2001)
Hypertonie	TRAK1	(Gilbert et al., 2006)
Polycystite rénale	Kif3B	(Lin et al., 2003)
Asymétrie droite - gauche (embryogénèse)	Kif3B	(Nonaka et al., 1998)
Transport de virus	Kif5B	(Rietdorf et al., 2001)
Maladie neurodégénérative	kinésines	(Gunawardena et Goldstein, 2004)

De plus, un groupe de kinésine est essentiel au cours de la mitose. Ces kinésines dites mitotiques, se révèlent vitales lors des mécanismes moléculaires de la division cellulaire. Treize moteurs mitotiques ont pu être ainsi identifiés chez l'homme depuis quelques années. Ces kinésines interviennent dans la formation du fuseau mitotique (KifC1, Kif2A, et Eg5), les mouvements des chromosomes (CENP-E, MCAK, Kif14, Kif18, et Kid) et la cytokinèse (Kif4A, Kif4B, MPP1, MKLP-1 et MKLP-2). Ces protéines sont des cibles thérapeutiques potentielles, pouvant conduire à des applications anticancéreuses innovantes. En effet, l'inhibition de certaines d'entre-elles provoque des phénotypes d'arrêt mitotique permettant d'envisager l'emploi d'inhibiteurs de ces kinésines dans le but de limiter la prolifération des cellules cancéreuses. L'avantage de cette approche sur les drogues anti-mitotiques classiques tels que les *Vinca-alcaloïdes* et les *taxanes*, est l'utilisation d'inhibiteurs adressés à une protéine qui intervient spécifiquement au cours de la mitose. Car en bloquant la dynamique des microtubules, les drogues de types *vinca-alcaloïdes* ou *taxanes* vont certes bloquer la mitose, mais aussi interférer avec de nombreux processus non-mitotiques dépendant de la dynamique du cytosquelette. Ces drogues figeant (*taxanes*) ou déstructurant (*vinca-alcaloïdes*) les microtubules provoquent alors des effets secondaires indésirables (neurotoxicité, neutropénie...) et se heurtent à une adaptation des cellules tumorales, capables de développer des résistances contre ces composés.

1.2. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus par lequel une cellule duplique son contenu puis se divise pour aboutir à deux cellules filles identiques. Orchestré par des processus de régulation complexes, ce cycle est constitué d'un ensemble d'événements moléculaires et cellulaires gérés spatialement et temporellement. Chez les eucaryotes, l'évolution de ce phénomène répond à l'activation périodique et séquentielle de kinases (Cdk) par des protéines appelées cyclines, synthétisées puis détruites elles aussi périodiquement et séquentiellement. On peut schématiser le cycle cellulaire par une succession de phases participant au maintien de l'information génétique, génération après génération (**figure 8**). C'est au cours de la phase M, étape clef de la division cellulaire, qu'auront lieu deux divisions successives : la mitose (séparation des chromosomes) et la cytokinèse (scission du cytoplasme).

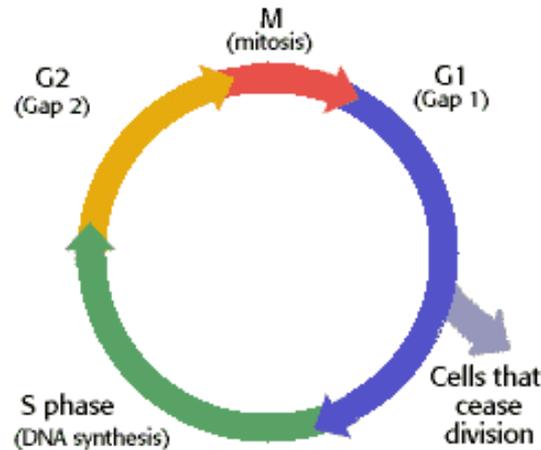


Figure 8 : Description des transitions abordant le cycle cellulaire. Il est composé des quatre événements morphologiques suivants :

- **La phase G1** (Gap1) est une période de croissance pourvue d'une forte activité de synthèse et de transcription. La cellule à la possibilité d'entrer en phase de quiescence (G0) ou de se différencier au cours de cette étape.
- **La phase S** (Synthèse) a pour vocation la répllication du matériel chromosomique.
- **La phase G2** (Gap2) prépare la mitose, notamment par la synthèse des protéines nécessaires à la division.
- **La phase M** permet la répartition des chromosomes dupliqués, et le partage du cytoplasme dans les deux cellules filles.

1.2.1. La mitose

La mitose à pour objectif la ségrégation équitable de l'information génétique dédoublée en phase S afin d'aboutir à la genèse de deux cellules filles viables. Cette étape clef est composée de cinq subdivisions successives : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (**figure 9**). Cette cascade d'événements mitotiques est alors régie par un ensemble complexe de protéines permettant la régulation et l'organisation de la division cellulaire. Parmi elles, les kinésines mitotiques jouent un rôle majeur dans ces différentes étapes.

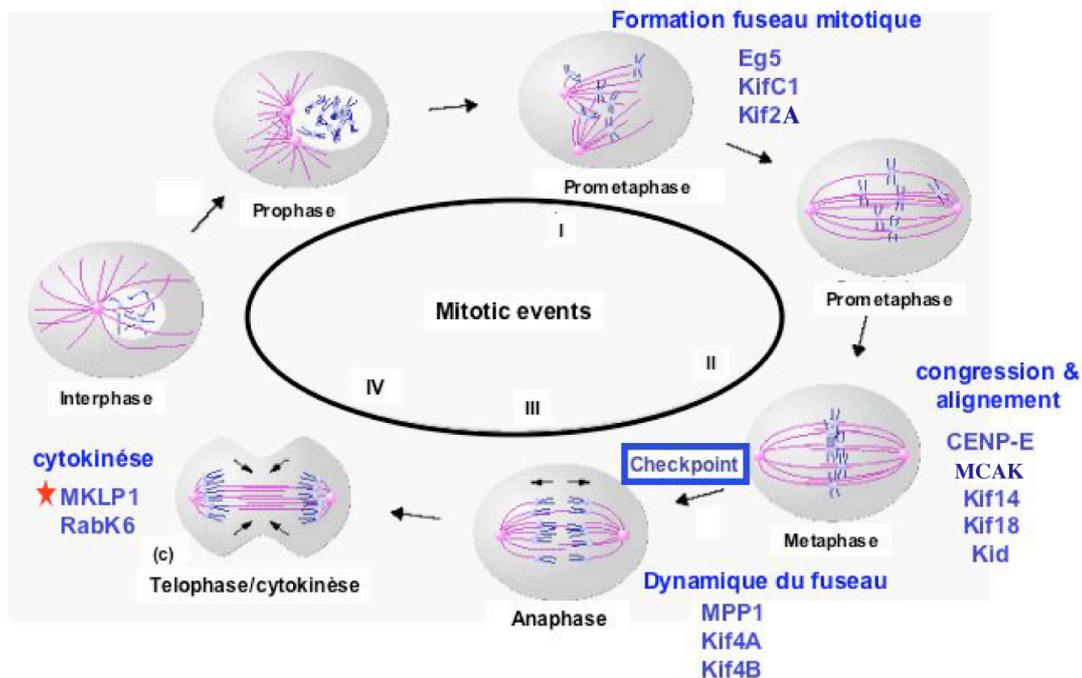


Figure 9 : Schéma et phénotype du cycle cellulaire avec la représentation des chromosomes et des microtubules. Les différentes étapes clefs de la mitose et l'état interphasique sont représentés dans ce cycle. Les kinésines mitotiques participant aux multiples événements mitotiques sont indiquées à titre indicatif. Il y a chez l'homme 13 kinésines mitotiques identifiées (Wood et al., 2001 ; Zhu et al., 2005b).

Au cours de la prophase - prométaphase, les chromosomes se condensent en structures organisées sous l'impulsion de la phosphorylation des histones (Oki et al., 2007). Les deux centrosomes s'éloignent et se positionnent de chaque côté de la cellule. Leur position dictera l'emplacement de la plaque équatoriale et du sillon de clivage qui se situeront dès lors, entre ces deux pôles organisateurs des microtubules. Au cours de la prométaphase, l'enveloppe nucléaire se fragmente et libère les chromosomes bientôt captés par les microtubules *via* le kinétochore. Pendant la métaphase, les chromosomes sont dirigés au centre de la cellule, puis alignés sur la plaque équatoriale. L'entrée en anaphase obéit à un point de contrôle gérant la transition métaphase – anaphase. La cellule anaphasique sera le foyer de la séparation des chromatides sœurs sous l'effet de traction exercée par le fuseau mitotique qui se collapsera ensuite en fin d'anaphase. Enfin, la télophase parachève la dichotomie génomique des deux

futures cellules filles par la reconstitution des membranes nucléaires. Au fur et à mesure de l'éloignement des deux lots chromosomiques sur deux pôles opposés, la cellule se divise en deux par invagination de sa membrane plasmique au niveau de la plaque équatoriale (sillon de clivage). Ce processus de constriction puise sa source dans le resserrement d'un anneau d'actine qui se poursuivra jusqu'à la séparation complète des deux cellules filles. Ce processus de cloisonnement est appelé la cytokinèse.

1.2.2. La cytokinèse

La division cellulaire implique la croissance de la cellule et une séquence d'événements ordonnés : la réplication du génome, la ségrégation des chromosomes puis la division de la cellule. Bien que de nombreux aspects de ces processus cellulaires soient aujourd'hui bien étayés à l'échelle moléculaire, la scission de la cellule (cytokinèse) est une étape complexe moins connue. Cependant, un ensemble de protéines conservées forme le cœur de cette machinerie chez de nombreuses espèces animales divergentes (vertébrés, nématodes et insectes). Les acteurs de la régulation de la cytokinèse sont répartis en cinq catégories :

- Les composants du fuseau central,
- RhoA et ses effecteurs
- La myosine non musculaire de type II
- L'actine et les régulateurs de son assemblage
- Les facteurs du transport et de fusion membranaire.

Le déroulement de la cytokinèse nécessitera l'organisation d'un réseau de myosines et de filaments d'actines. La force de contractions de cet anneau d'actomyosine permettra l'apparition du sillon de clivage délimitant les deux futurs lobes cellulaires naissants (**figure 10**). La position de l'anneau contractile sera dictée par la localisation du fuseau mitotique anaphasique, tandis que son assemblage sera sous la régulation du fuseau central et de la voie de signalisation RhoA. Après la constriction maximale permise par l'anneau d'actomyosine, la séparation des deux cellules est finalisée par l'apport de phospholipides via l'adressage de vésicules membranaires au niveau du pont cytoplasmique.

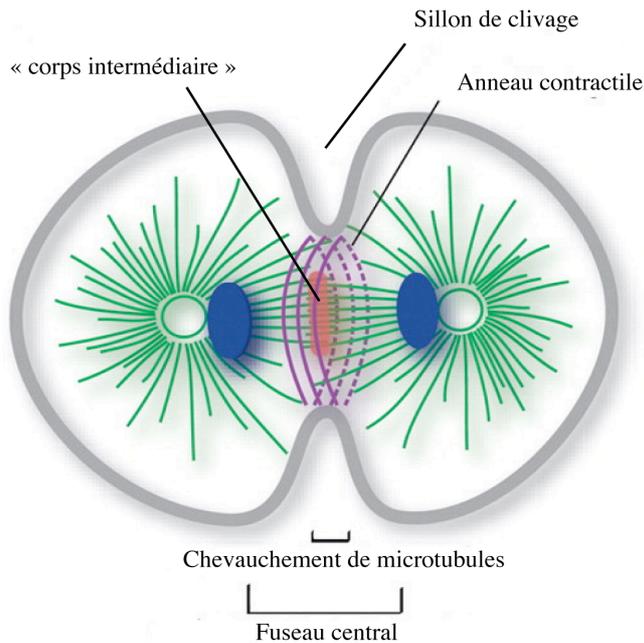


Figure 10 : Schéma d'une cellule en division (microtubules représentés en vert, l'ADN en bleu, le « corps intermédiaire » en rouge et l'anneau d'actomyosine en violet). L'anneau d'actomyosine et le « corps intermédiaire » sont des structures essentielles à la cytokinèse. D'après Glotzer (2005).

a. Le fuseau central

La cytokinèse débute dès l'anaphase avec la formation d'un premier élément au sein du fuseau central : le « corps intermédiaire ». Cette structure aura pour fonction la régulation de l'anneau contractile et l'adressage des membranes nécessaires à la finalisation de la séparation des cellules filles. Le « corps intermédiaire » est formé d'un échafaudage complexe de régulateurs de la cytokinèse, concentrés sur un chevauchement robuste et dense de microtubules antiparallèles au centre du fuseau central. Sa mise en place résultera de l'inactivation de kinases mitotiques suite à la dégradation protéolytique des cyclines en début d'anaphase.

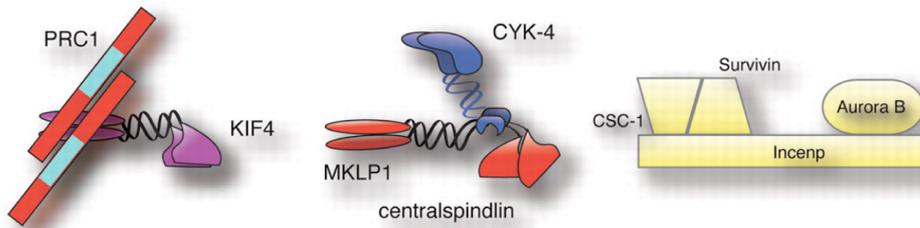
Parmi les protéines qui s'accumulent au cœur du « corps intermédiaire », certaines se révèlent indispensables pour la cytokinèse (**tableau 2**). C'est par exemple le cas du « centralspindlin complex » qui participe à l'agrégation des microtubules. Ce complexe, composé des deux

protéines MKLP-1 et MgcRacGAP, tend à se concentrer au cours de l'anaphase sur le fuseau central, là où les extrémités (+) des microtubules polaires se chevauchent (Delcros et al., 2006). Les deux protéines constitutives du « centralspindlin complex » (MKLP-1 et MgcRacGAP) sont essentielles à l'assemblage et à la maturation du « corps intermédiaire » (Mishima et al., 2002). La localisation du « centralspindlin complex » est dépendante du complexe AuroraB kinase (AuroraB, Incenp, Survivin, et CSC-1) qui se concentre lui aussi dans le fuseau central (Schumacher et al., 1998 ; Severson et al., 2000). L'inhibition de l'activité d'AuroraB provoque d'ailleurs un défaut de cytokinèse similaire à une déplétion de MKLP-1 chez *C. elegans*. En plus de réguler la localisation du « centralspindlin complex », AuroraB phosphorégule *in vitro* la fonction de la protéine MgcRacGAP (Ban et al., 2004 ; Minoshima et al., 2003).

Parmi les autres protéines essentielles, PRC1 est une protéine MAP (Microtubule Associated Protein) possédant une activité d'agrégation des polymères de tubuline (Verni et al., 2004 ; Verbrugghe et White, 2004). PRC1 localise au niveau du « corps intermédiaire », et est requise pour l'organisation de cette structure. La kinésine Kif4 interagit avec PRC1 (Kurasawa et al., 2004) et restreint sa localisation sur cette étroite bande au centre du fuseau mitotique. L'affinité de PRC1 pour les microtubules est sous la régulation de Cdk1, qui inhibe sa capacité d'agrégation durant la métaphase (Mollinari et al., 2002).

Suivant les espèces, de nombreuses autres protéines s'enrichissent au niveau du fuseau central de l'anaphase à la télophase. Il a ainsi été mis en évidence l'accumulation de protéines telles que NuSAP (Nuclear Spindle-Associated Protein), Orbit, ou l'anti-oncogène BRCA2, qui affectent elles aussi le fuseau central et la progression de la cytokinèse de façon encore méconnue (Daniels et al., 2004 ; Inoue et al., 2000 ; Raemaekers et al., 2003).

De plus, si de nombreuses protéines sont conservées dans le processus de cytokinèse, des différences subsistent selon les espèces. Ainsi chez la drosophile, le manque de la sous-unité MKLP-1 induit l'absence de l'anneau d'actomyosine (Adams et al., 1998), tandis que le phénotype *drosophila* semble suggérer une voie de régulation redondante qui comble la déplétion de MKLP-1 lors de l'assemblage de l'anneau contractile (Dechant et Glotzer, 2003).



Nomenclature of the central spindle

	<i>H. sapiens</i>	<i>D. melanogaster</i>	<i>C. elegans</i>
<u>Microtubule Associated Protein</u>			
PRC1	PRC1	Fascetto	SPD-1
KIF4	KIF4	KLP3A	KLP-19
<u>Centralspindlin complex</u>			
CYK-4	MgcRacGAP	RacGAP50C	CYK-4
MKLP1	MKLP1	Pavarotti	ZEN-4
<u>Aurora kinase complex</u>			
Aurora B	Aurora B	Aurora B	AIR-2
Incenp	Incenp	Incenp	ICP-1
Survivin	Survivin	Deterin	BIR-1
CSC-1	Dasra/Borealin	Borealin	CSC-1
<u>RhoGEF</u>			
ECT2	ECT2	Pebble	LET-21

Tableau 2 : Nomenclature des protéines cytokinetiques concentrées au niveau du « corps intermédiaire » et participant à son organisation. Un bref modèle schématique de leurs assemblages moléculaires est aussi présenté. D’après Glotzer (2005).

b. La voie de signalisation RhoA

L’assemblage de l’anneau contractile d’actine est sous contrôle du fuseau central qui active la charpente d’actomyosine *via* une cascade de signalisation initiée par RhoA (petite protéine G) (**figure 11**). RhoA est un acteur indissociable de l’assemblage et de la régulation de cet anneau. De façon générale, les petites protéines G fonctionnent comme des interrupteurs moléculaires de voie de signalisation intracellulaire. Elles existent sous deux conformations : la forme active liée au GTP et la forme au repos liée au GDP. Comme les autres protéines englobées sous le terme de « petites protéines G », RhoA est régulée par des facteurs induisant l’hydrolyse du GTP (GTPase Activating Protein [GAP]) ou l’échange nucléotidique (Guanine Exchange Factors [GEF]). Au cours de la cytokinèse, la GEF responsable de l’activation de RhoA est identifiée comme ECT2, alors qu’une de ses GAP

supposées serait MgcRacGAP. La protéine MgcRacGAP est néanmoins un régulateur non spécifique à RhoA, aussi capable d'induire l'hydrolyse nucléotidique de Rac et de Cdc42 de façon plus efficace ((Tatsumoto et al., 1999 ; Toure et al., 1998).

c. La myosine, force motrice de la cytokinèse

En amont de la voie de signalisation RhoA, la forme RhoA•GTP induit la polymérisation et l'activation des myosines-2 (**figure 11**). La myosine est un des partenaires essentiels du mécanisme de séparation des deux cellules filles. Elle intervient dans la formation du sillon de clivage en fournissant le travail mécanique de la constriction de l'anneau d'actomyosine (Guo et Kemphues, 1996 ; Straight et al., 2003). La myosine s'organise en deux chaînes lourdes parallèles liées chacune à une chaîne légère dite essentielle (Elc) ainsi qu'à une autre chaîne légère dite régulatrice (rMlc). Cette hexamère s'assemble en filaments et permet la constriction de l'anneau contractile en transloquant les filaments d'actines. La phosphorylation de rMlc par la kinase ROCK (Rho kinase) soulève l'état d'auto-inhibition de la myosine (Jordan et Karess, 1997). Sous sa forme active, la myosine est dès lors capable de s'assembler en filament et possède une activité ATPasique actine dépendante. La protéine RhoA est l'instigatrice de la régulation des myosines-2 ; elle active la Rho Kinase ROCK qui à son tour inhibe par phosphorylation MYPT (myosin phosphatase-targeting), un répresseur de la myosine (**figure 11**) (Kimura et al., 1996).

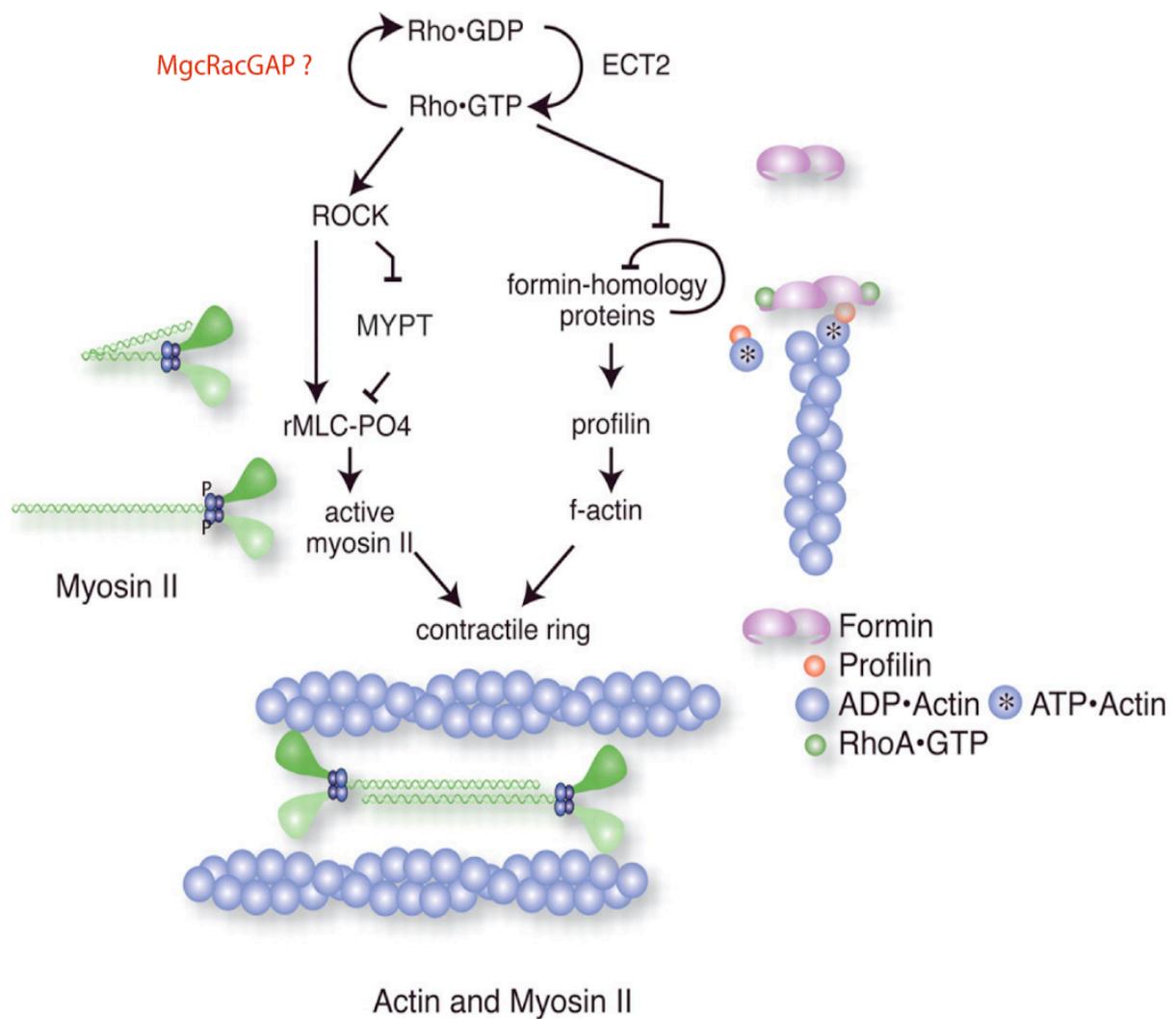


Figure 11 : Voie de signalisation RhoA. RhoA•GTP stimule la myosine-2 et l'assemblage des filaments d'actines en activant la kinase ROCK. RhoA induit indirectement la phosphorisation de rMlc, la chaîne légère régulatrice de myosine et permet ainsi l'activation et l'assemblage de la myosine en filaments. RhoA•GTP lève l'auto-inhibition de la formine et permet l'élongation processive des filaments d'actines en partenariat avec la profiline. Figure d'après Glotzer (2005).

d. Assemblage de l'anneau contractile

La myosine-2 et l'actine sont les deux constituants majeurs de l'anneau contractile. Néanmoins, ces deux protéines ne se suffisent pas à elles-mêmes ; elles nécessitent un jeu de protéines partenaires pour leur assemblage sous forme de ceinture. Ainsi, trois protéines ont été mises en évidence en raison de leur active participation à l'établissement des filaments d'actine. Ces trois protéines que sont la formine, la profiline et l'aniline, sont essentielles au bon déroulement de la cytokinèse.

La formine coiffe l'extrémité du filament et permet par un mécanisme encore ambigu d'assembler les polymères d'actines de façon rapide et processive (Pruyne et al., 2002). Cette élongation se fait en partenariat avec la profiline, qui stimule le processus de polymérisation (Romero et al., 2004). *In vivo*, la formine s'auto-inhibe en liant ses deux extrémités N et C terminales. La forme RhoA•GTP permettra alors l'élongation des filaments d'actine en levant l'auto-inhibition de la formine (Alberts, 2001).

e. Fusion membranaire

Le système d'actomyosine n'est pas suffisant à lui seul pour parachever la séparation fine des deux cellules en division cytoplasmique. L'ultime étape de la cytokinèse va requérir la délivrance de vésicules d'apport membranaire. La fusion de ces vésicules avec la surface plasmique, après l'aboutissement constrictif de l'anneau d'actomyosine, permettra la disparition du pont cytoplasmique (Low et al., 2003). La machinerie d'insertion de membranes fera intervenir les syntaxines et leurs protéines associées, la famille des rab GTPases, le coatomère et le complexe exocyste. L'adressage des phospholipides à ce qui ne sera plus qu'un pont cytoplasmique étroit, sera finalement pourvu par des kinésines impliquées dans le transport de membranes (Fan et Beck, 2004).

1.3. Fonction et régulation du « centralspindlin complex »

Le « centralspindlin complex » est un élément impliqué dans la formation du « corps intermédiaire ». Ce complexe est constitué d'un homodimère de MKLP-1 lié à MgcRacGAP lui aussi homodimérique. Il a été montré que les acides aminés 445 à 550 de MKLP-1 forment le point d'ancrage de ces deux protéines avec les résidus 1 à 120 de MgcRacGAP (Pavicic-Kaltenbrunner et al., 2007). Nous verrons dans ce chapitre l'organisation structurale de chacune de ces deux partenaires ainsi que leurs régulations et fonctions cellulaires.

1.3.1. Données structurales

a. Organisation structurale de la kinésine MKLP-1

MKLP-1 est une kinésine homodimérique de la famille 6, longue de 857 acides aminés et structurées en quatre domaines caractéristiques des kinésines (**figure 12**). Elle replie son domaine moteur globulaire sur son extrémité N terminale (Nislow et al., 1992) et est capable de mobilité vers les pôles (+) des microtubules.

La structure atomique de MKLP-1 n'a pas encore été élucidée, mais à la connaissance des motifs conservés chez les kinésines, on peut estimer la disposition des différents domaines de MKLP-1 :

Le domaine moteur (25-436) de 411 acides aminés constitue le noyau catalytique qui contient le site d'hydrolyse de l'ATP ainsi qu'un site de liaison aux microtubules. La principale différence de MKLP-1 face autres kinésines consiste en une importante insertion de quatre-vingts acides aminés (8 kDa) au sein de la boucle L6 alors qu'elle est généralement constituée de 4 à 8 résidus dans les autres sous-familles. Cette boucle L6 exceptionnellement longue est une caractéristique des kinésines de la famille 6 (MKLP-2, MPP1...). Aucune structure à haute résolution de kinésine de la sous-famille 6 n'a pu être obtenu à ce jour, et la fonction de cette boucle reste encore énigmatique (Hizlan et al., 2006).

Le domaine « cou » : le domaine moteur est en contact avec le domaine de dimérisation *via* une séquence de 104 acides aminés formant ce qu'on appelle le « cou » (436-540). C'est une

région-charnière déterminante pour le sens de déplacement. Cette région participe à l'interaction avec MgcRacGAP.

Le domaine de dimérisation de MKLP-1 ou domaine « tige » (540-618) est organisé en enroulement super hélice. Cette région intervient également dans l'interaction de MKLP-1 avec MgcRacGAP (Mishima et al., 2002).

Le domaine C-terminal de MKLP-1 ou « queue » (622-857). La fonction et le type de cargos reconnus par cette région sont inconnus chez MKLP-1. La queue intervient parfois chez d'autres kinésines dans la régulation du domaine moteur (Coy et al., 1999a).

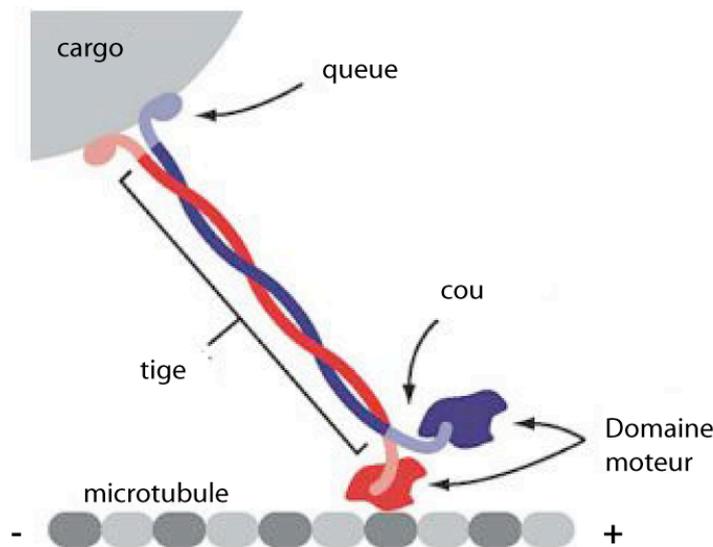


Figure 12 : MKLP-1 est une kinésine à moteur N-terminal. Elle hydrolyse l'ATP pour se déplacer vers l'extrémité + des microtubules. Elle est constituée de quatre domaines : Un domaine moteur (cœur catalytique et zone d'interaction aux microtubules), lié à un domaine de dimérisation en super-hélice *via* une courte région flexible (cou). L'extrémité C-terminale forme la queue, une région généralement associée à l'interaction avec les cargos. D'après Steven A. Block

localisation membranaire lipide dépendant (Hurley et Meyer, 2001). De plus, il a été mis en évidence *in vitro*, une interaction entre MgcRacGAP et la protéine transmembranaire Tat1 (Toure et al., 2001).

Le domaine GAP (360-536) permet l'activation de l'hydrolyse nucléotidique des petites protéines G. MgcRacGAP est capable *via* ce domaine de réguler *in vitro* plusieurs protéines G tels que RhoA, Cdc42 et Rac (Toure et al., 1998).

1.3.2. Rôles cellulaires du « centralspindlin complex »

MKLP-1 et MgcRacGAP sont intimement liés à la formation du « corps intermédiaire ». Interdépendants l'un de l'autre pour leur adressage cellulaire au cours de la phase M, la déplétion de l'un ou l'autre de ces deux partenaires suffit à induire un défaut d'adressage et d'achèvement de la cytokinèse (Jantsch-Plunger et al., 2000).

a. Régulation et localisation de MKLP-1

Généralement présente dans le noyau lors de l'état interphasique, le « centralspindlin complex » diffuse dans le cytoplasme lors de la déstructuration de celui-ci en prométaphase. Au cours de l'anaphase, MKLP-1 et sa partenaire tendent à se concentrer entre les deux lots chromosomiques émergents au niveau des microtubules du fuseau central (**figure 14**). Cette redistribution du « centralspindlin complex » est un mécanisme observé chez plusieurs régulateurs de la cytokinèse qui s'accumulent au sein du « corps intermédiaire » dès l'anaphase (Gruneberg et al., 2004).

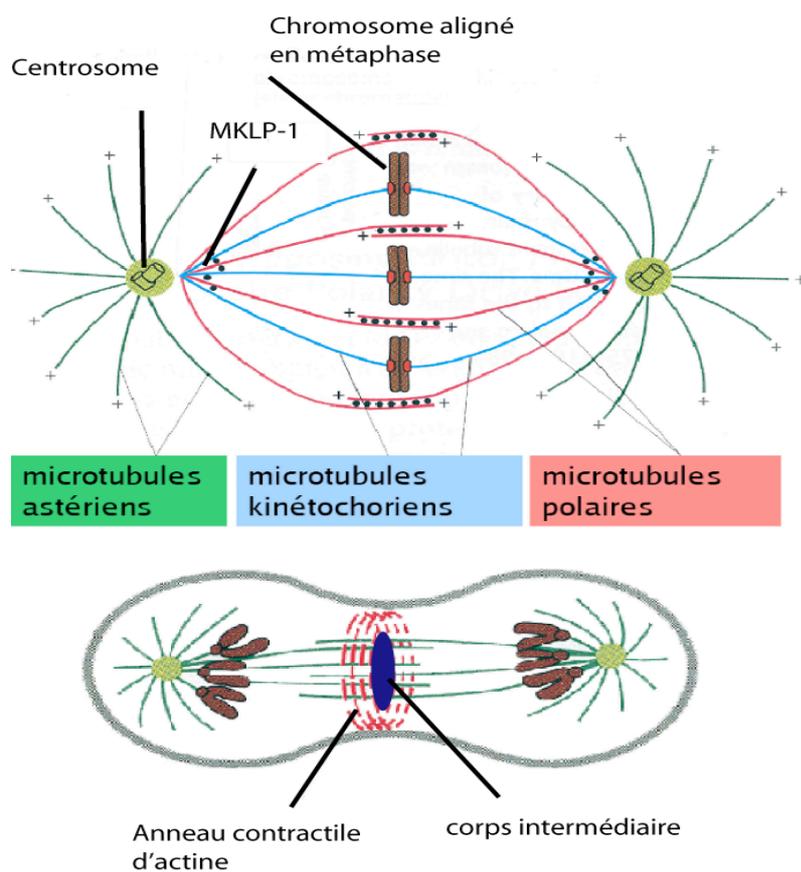


Figure 14 : (A) Mécanisme de la division cellulaire. Le fuseau mitotique est composé de microtubules organisés à chaque pôle *via* les centrosomes. Les microtubules kinétochoriens alignent et capturent les chromatides sœurs. (B) Lors de l'anaphase, MKLP-1 va se concentrer au niveau du fuseau central, et les microtubules polaires vont se collapser en une zone dense appelé « corps intermédiaire ».

Cette localisation est en partie expliquée par une régulation temporelle, induite par le couple Cdk1/cyclinB. En effet, MKLP-1 possède deux sites de phosphorylation (Tyr 8 et Tyr 450) reconnus par Cdk1 (**figure 15**). La phosphorylation de ces deux sites, notamment la Tyrosine 8, induit une inhibition de l'activité motrice de la kinésine MKLP-1 et une forte diminution de son affinité pour les microtubules (Mishima et al., 2004). Cette régulation du « centralspindlin complex » est à l'origine de sa diffusion cytoplasmique et de sa faible localisation au niveau du cytosquelette lors de la prophase et de la métaphase. À la transition métaphase-anaphase, la levée de cette inhibition permet l'adressage et la concentration du « centralspindlin complex » dans le « corps intermédiaire ».

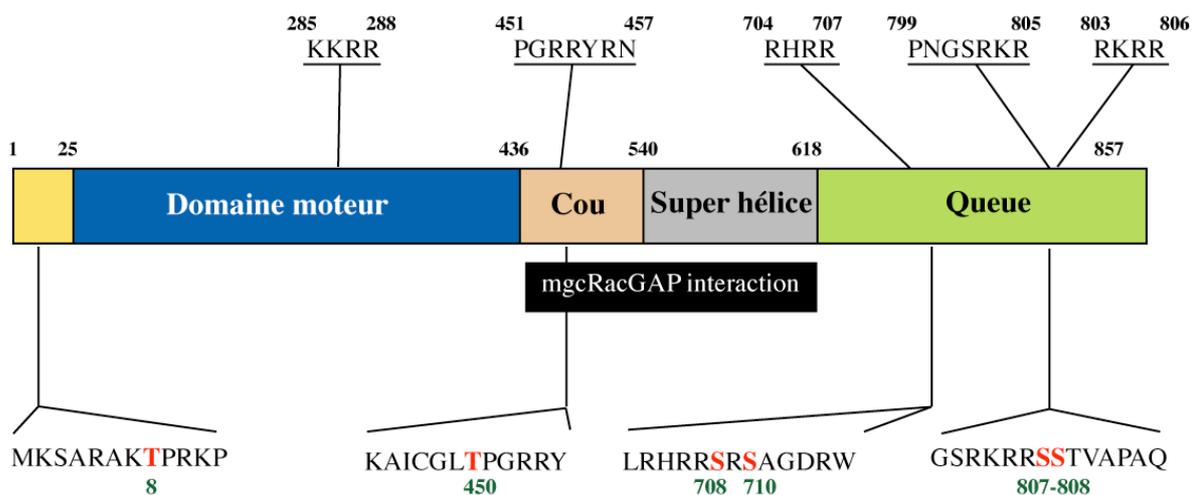


Figure 15 : Représentation schématique de MKLP-1. Sont recensés les 5 motifs d'adressage nucléaire (NLS) en haut et les sites de phosphorylation en dessous. Il est indiqué en noir la zone d'interaction de MKLP-1 mis en jeu dans l'association avec MgcRacGAP. Les thréonines 8 et 450 sont ciblées par Cdk1 et phosphorégulent l'activité du domaine moteur. Représentées en rouge, les serines 708 et 710 sont phosphorylées par AuroraB et les serines 807 et 808 phosphorylées par la Polo-like kinase 1.

Régulation de la queue de MKLP-1

La séquence C-terminale de MKLP-1 formant la queue est elle aussi la cible de diverses phosphorylations nécessaires au processus d'achèvement de la cytokinèse (**figure 15**). Cette région contient quatre sites conservés, la Ser 708 et la Ser 710, substrats de AuroraB et les Ser 807 et Ser 808, substrats de la Polo-like kinase 1 (Lee et al., 1995 ; Liu et al., 2004). Les phosphorylations par ces deux kinases sur la queue de MKLP-1 sont peu documentées, mais il a été montré chez *C. elegans* que la phosphorylation par AuroraB des sites Ser 708 et Ser 710 est requise pour la séparation finale des deux cellules filles (Guse et al., 2005). De même, la phosphorylation par Plk1 des sites Ser 807 et Ser 808 est aussi nécessaire à l'aboutissement de la cytokinèse, mais à l'instar des sites Ser 708 et Ser 710, aucune étude ne permet encore d'établir les effets moléculaires exacts, sous-jacents à ces phosphorégulations. Le défaut de cytokinèse induit par la non phosphorylation de la queue de MKLP-1 par AuroraB et Plk1 sont néanmoins similaire ; le pont cytoplasmique entre les deux cellules filles persiste après la constriction de l'anneau d'actomyosine. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le domaine

« queue » de MKLP-1 est capable d'interagir avec des protéines de la famille Arf impliquées dans le trafic membranaire (Boman et al., 1999).

HsMKLP-1 arbore cinq motifs d'adressage nucléaire (NLS) sur les sites 285-288, 451-457, 704-707, 799-805, et 803-806 (**figure 15**). Néanmoins, malgré la présence de cinq sites consensus, seules les deux séquences NLS de la queue sont désignées expérimentalement comme des signaux majeurs d'adressage nucléaire (799-805 ; 803-806) (Deavours et Walker, 1999). Le site de phosphorylation de la Ser 807 régulerait l'adressage nucléaire de MKLP-1 (Neef et al., 2006). Ainsi la phosphorylation par AuroraB lors de l'anaphase empêcherait MKLP-1 de rejoindre l'enveloppe nucléaire en reformation en fin de cytokinèse.

Cas particulier des neurones et des podocytes

À l'exception des autres types cellulaires et malgré la présence de séquences NLS, la localisation interphasique de MKLP-1 dans les neurones et les podocytes n'est pas nucléaire, mais adressée au niveau des dendrites et des pédicelles. Cette kinésine est recrutée dans ces types cellulaires pour la mise en place de structures singulières nécessitant des faisceaux de microtubules antiparallèles (Kobayashi et Mundel, 1998 ; Kobayashi et al., 1998 ; Yu et al., 1997). La capacité de MKLP-1 à ponter des microtubules à polarité inversée (Nislow et al., 1992), permet la différenciation des dendrites en maintenant sur leur longueur des fibres microtubulaires orientées non uniformément tout le long du dendrite (**figure 16**). Cette caractéristique induite par MKLP-1, contraste avec les axones constitués uniquement de microtubules à extrémité distale positive, uniformément polarisée vers leur périphérie (Yu et al., 2000). L'organisation de faisceaux microtubulaires antiparallèles au sein des dendrites, permet alors l'adressage spécifique de cargos tirés par des moteurs moléculaires capables de mobilité vers l'extrémité (-) des microtubules. Si le mécanisme en jeu dans la formation de ces structures antiparallèles n'a pas été identifié, il a cependant été mis en évidence l'importance du domaine queue de MKLP-1 dans la différenciation des dendrites (Xu et al., 2006).

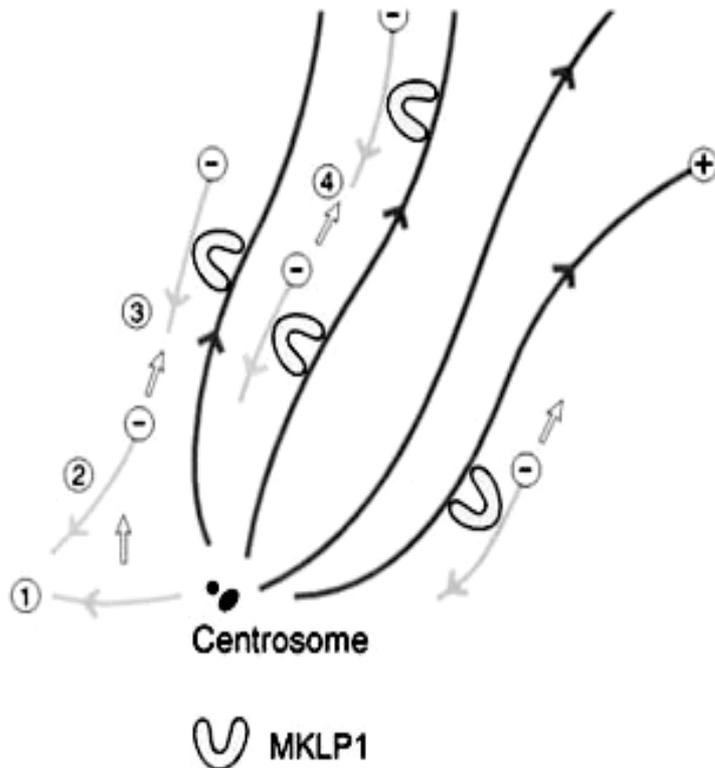


Figure 16 : Modèle représentant la formation, par MKLP-1, des microtubules à polarité non uniforme dans les dendrites et podocytes. Les symboles (-) et (+) indiquent les extrémités α et β des microtubules (polarité aussi symbolisée par la flèche). (1) Le microtubule est polymérisé à partir du centrosome. (2) Séparation du centrosome. (3) MKLP-1 capte et ponté les microtubules de façon antiparallèle puis (4) transporte les brins à polarité inversée vers la périphérie. D'après Kobayashi et *al.*, (1998).

b. Régulation et localisation de MgcRacGAP : le complexe MgcRacGAP / ECT2

MgcRacGAP, second constituant du « centralspindlin complex », présente la même localisation que MKLP-1 au cours du cycle cellulaire. Protéine essentielle à l'évolution de la cytokinèse, elle agit en amont du cycle de régulation de la voie de signalisation RhoA (formation et constriction de l'anneau d'actomyosine). Il est proposé qu'elle agirait de concert avec la RhoGEF ECT2, pour favoriser l'échange nucléotidique de RhoA (**figure 17**).

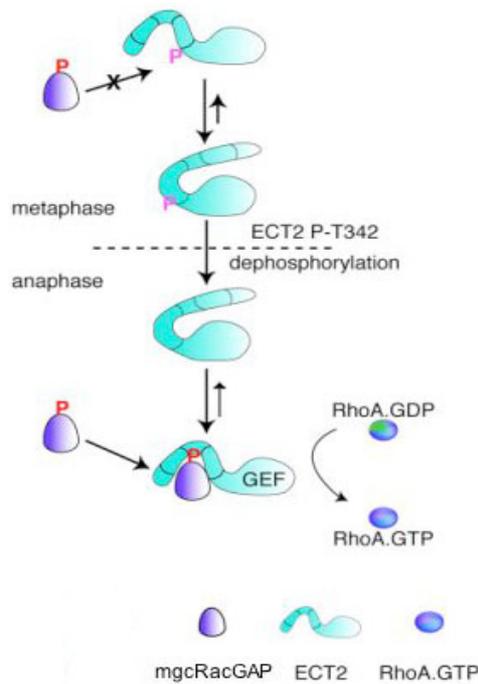


Figure 17 : Modèle de l'association régulée entre la RhoGAP et RhoGEF (MgcRacGAP et ECT2), *via* la déphosphorylation de la tyrosine 342 d'ECT2. À la transition métaphase / anaphase, la tyrosine 342 d'ECT2 est déphosphorylée et permet alors l'association entre MgcRacGAP et ECT2. Cet assemblage stimule l'activité RhoGEF d'ECT2 et induit l'échange nucléotidique de RhoA•GDP, activant ainsi la voie de régulation RhoA. D'après Yüce et *al.*, (2005).

Paradoxalement, malgré son activité GAP stimulant la formation du complexe RhoA•GDP pourtant défavorable à l'élaboration de l'anneau d'actomyosine (RhoA•GTP étant la forme activatrice), MgcRacGAP est un élément essentiel à l'instauration de l'assemblage de cette structure (Zhao et Fang, 2005). Il a été montré que l'association tripartite entre le « centralspindlin complex » et ECT2 était autorisée en début d'anaphase suite à la déphosphorylation de la Tyrosine 342 d'ECT2 (Yuce et al., 2005) (**figure 17**). Or, cette interaction semble stimuler l'activité RhoGEF, et impulser l'activation de RhoA•GTP (Nishimura et Yonemura, 2006).

De nombreux facteurs influent sur cette association « centralspindlin complex »/ECT2. Le couple de kinases Cdk1 et AuroraB ainsi que la phosphatase PP2A participent de façon ambiguë (Toure et al., 2008). De même, la Polo-like kinase 1 (Plk1) joue elle aussi un rôle majeur dans cette reconnaissance (**figure 18**) ainsi que dans plusieurs étapes de la cytokinèse (Petronczki et al., 2007 ; Petronczki et al., 2008).

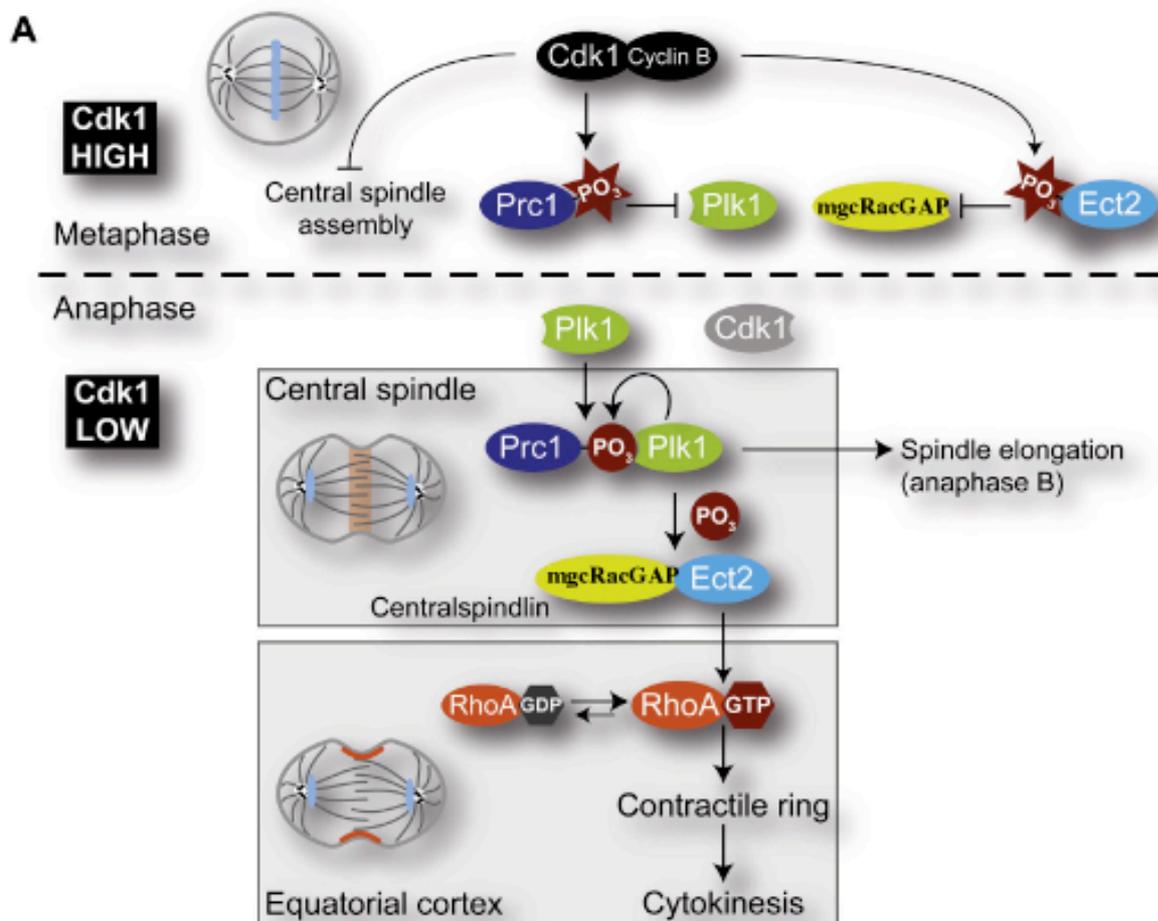


Figure 18 : Modèle de la régulation de l'association ECT2 / « centralspindlin complex » via Plk1. La phosphorégulation de PRC1 par Cdk1/cycline B bloque l'interaction de Plk1 avec PRC1 en métaphase. Simultanément, Cdk1 empêche la formation du couple MgcRacGAP/ECT2. Quand l'activité de Cdk1 décline après l'anaphase, Plk1 phosphoryle PRC1 et interagit fortement avec celle-ci. L'activation de PRC1 provoque l'accumulation de Plk1 dans le fuseau central, où PRC1 participe à la formation du « corps intermédiaire ». Successivement, l'activité de Plk1 favorisera l'assemblage MgcRacGAP/ECT2 via un mécanisme encore non résolu. Sous cette impulsion ECT2 co-localise avec le « centralspindlin complex » qui active sa fonction GEF. Ainsi activé, RhoA•GTP va promouvoir la formation de la ceinture d'actomyosine et entamer la séparation des deux cellule filles. D'après Petronczki et *al.*, (2008).

c. Régulation et localisation de MgcRacGAP : Activation de la voie RhoA

Si les hypothèses actuelles ne mettaient pas encore en évidence un lien direct de la régulation de la cytokinèse entre le « corps intermédiaire » et l'anneau contractile, une étude récente révèle une connexion de l'anneau d'actine avec les composants régulateurs du « corps intermédiaire ». Ainsi, MgcRacGAP *via* un site d'interaction avec l'aniline (un constituant des filaments d'actomyosine) permettrait un ancrage d'ECT2 par l'adressage du « centralspindlin complex » dans la zone corticale. Cette organisation favoriserait ainsi l'invagination de la membrane jusqu'à la formation du pont cytoplasmique (**figure 19**) (Field et Alberts, 1995 ; Gregory et al., 2008 ; Nishimura et Yonemura, 2006).

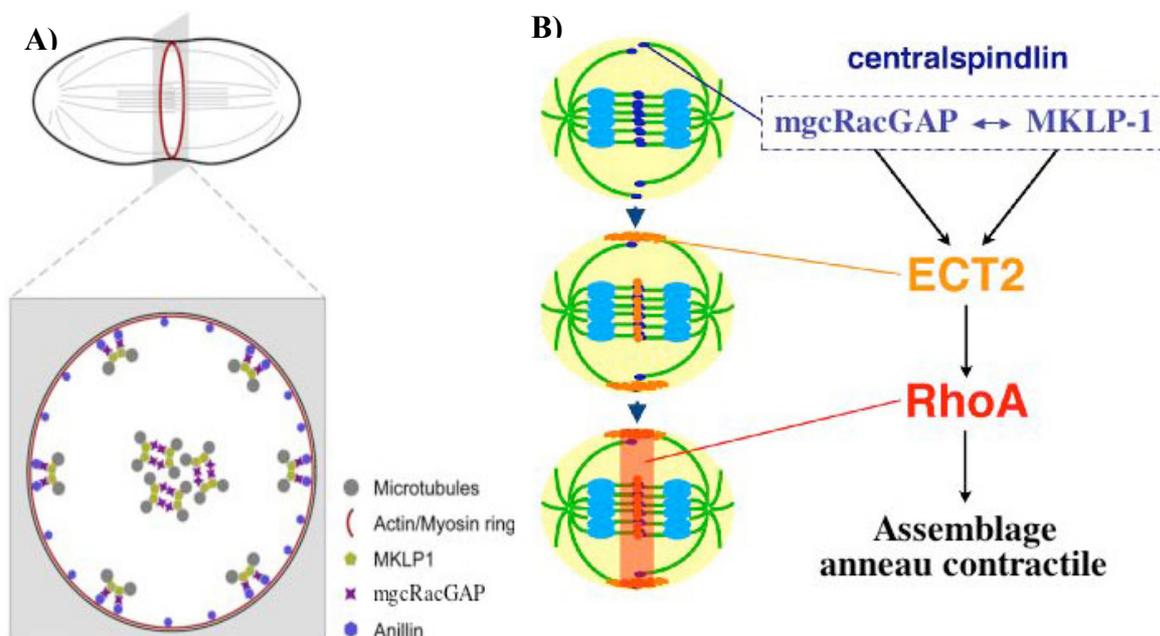


Figure 19 : (A) Schéma de la section équatoriale d'une cellule en division en cours de l'anaphase. Le « centralspindlin complex » est concentré au niveau du « corps intermédiaire » et s'adresse sur l'anneau contractile d'actine *via* une interaction entre MgcRacGAP et l'aniline. (B) Le « centralspindlin complex » est aussi localisé en partie dans les microtubules astériens au niveau du cortex équatorial *via* une interaction avec l'aniline. La RhoGEF ECT2 co-localise avec le « centralspindlin complex » sous la pression régulatrice de Plk1 et PP2A après l'anaphase. Activé par MgcRacGAP, ECT2 induit l'échange nucléotidique de RhoA•GDP et provoque localement l'assemblage de l'anneau d'actomyosine sur le cortex équatorial. D'après Gregory et al., (2008) et de Nishimura et al., (2006).

C'est donc lors de la transition métaphase-anaphase, accompagnée par une décroissance de l'activité de Cdk1, que va s'agencer par le biais de relocalisations et de phosphorégulations, la mise en place des processus aboutissant à la cytokinèse. À cette régulation temporelle s'accompagne une régulation spatiale à l'origine de l'élaboration locale d'un anneau contractile sur le pourtour de la plaque équatoriale. Le « centralspindlin complex » comme de nombreux autres effecteurs de la cytokinèse est au centre de ce jeu de régulation, où il intervient en tant que complexe d'échafaudage faisant le lien entre le « corps intermédiaire » et la ceinture d'actine.

Néanmoins il est important de noter que le couple ECT2 / « centralspindlin complex » n'est peut-être pas l'unique activateur de la voie de régulation RhoA. En effet, une autre RhoGEF, GEF-H1, paraît être une voie redondante permettant l'activation de la petite GTPase RhoA (Birkenfeld et al., 2007). Encore aujourd'hui, les mécanismes fins de ces régulations et notamment de la voie de régulation RhoA sont le fruit de nombreuses études visant à clarifier le rôle de chacun des acteurs de la cytokinèse. Ainsi, une hypothèse récemment émise, soumet l'idée qu'ECT2 n'interviendrait que dans le recrutement de RhoA, esquissant GEF-H1 comme le stimulateur majeur de la voie RhoA (Bement, 2007).

1.3.3. Le « centralspindlin complex » et la cytokinèse

Le « centralspindlin complex » participe à de nombreux mécanismes régulateurs aboutissant à la séparation des deux cellules filles. On a pu observer que ce complexe tenait un rôle prépondérant lors de la cytokinèse où il intervient en tant que complexe d'échafaudage et activateur indirect de la voie RhoA. Régulés spatialement et temporellement, MKLP-1 et MgcRacGAP recrutent et activent des éléments régulateurs de la formation du « corps intermédiaire » ainsi que de l'anneau contractile. La compréhension des processus impliquant ce complexe est fondamentale pour améliorer nos connaissances sur la division cellulaire, et notamment la cytokinèse.

Objectifs des travaux de la thèse

L'objectif principal de cette thèse a consisté à l'étude des aspects biochimiques, enzymatiques et structuraux du « centralspindlin complex ».

Une partie des travaux réalisés ont impliqué la caractérisation de la boucle L6 de MKLP-1. Cette boucle L6 est singulière chez MKLP-1 et les autres kinésines de la sous-famille 6 en raison de son atypique séquence longue de 80 résidus. Cette boucle différencie la sous-famille 6 aux autres sous-familles qui possèdent toutes des boucles L6 relativement courtes de quelques acides aminés. Cette caractéristique conservée au sein de la sous-famille 6 n'a jamais été la cible d'investigation ; j'ai donc entrepris de sonder le rôle de cette boucle en réalisant l'étude enzymologique comparative du domaine moteur sauvage de MKLP-1 et d'un mutant où la boucle L6 native fut remplacée par la boucle plus courte de la kinésine conventionnelle Kif5B (5 résidus).

De plus, la kinésine mitotique MKLP-1 étant un effecteur essentiel de la cytokinèse, j'ai réalisé le criblage de plusieurs chimiothèques afin de trouver de nouveaux inhibiteurs ciblant l'activité ATPasique de cette enzyme clef de la division cellulaire. Ce projet rentre dans le cadre de recherche de nouveaux composés anti-mitotiques basés sur l'inhibition de kinésines mitotiques.

L'hétérotétramère MKLP-1 / MgcRacGAP a été l'objet principal de cette thèse visant à la caractérisation structurale et fonctionnelle de ce complexe. Dans ce but, de nombreux domaines de ces deux protéines ont été clonés. Les constructions protéiques exprimées au cours de mes travaux auront notamment été utilisées dans des essais de cristallogénèse et dans la détermination du mécanisme de pontage de microtubules attribué au « centralspindlin complex ».

Chapitre 2

MATERIELS ET METHODES

2.1. Clonage de MKLP-1 et de MgcRacGAP

Le plasmide contenant l'ADNc de la kinésine MKLP-1 nous a été fourni par le Pr. J. Richard McIntosh de l'université du Colorado. Différentes constructions de cette kinésine ont été sous-clonées dans des vecteurs d'expression pET-28a, pET-M20 et pET-M30, entre les sites de restrictions *NcoI* et *XhoI*. Interférant avec la stratégie de clonage, le site *XhoI* endogène de MKLP-1 (bp 1374) a été éliminé par l'introduction d'une mutation silencieuse.

La stratégie de clonage, pour MKLP-1 et MgcRacGAP, a consisté en l'amplification par PCR de fragments codants pour les domaines d'intérêt, puis à les insérer dans des vecteurs d'expression compatibles avec des souches d'expression bactérienne d'*Escherichia coli*. Pour la majorité des clonages entrepris, le protocole de clonage a consisté en trois étapes principales :

- Élimination du site de restriction *XhoI* endogène de MKLP-1 par mutagenèse dirigée.
- Amplification par PCR des fragments d'intérêt.
- Insertion des fragments d'intérêt dans des vecteurs d'expression bactériens.

2.1.1. Élimination du site *NcoI* endogène de MKLP-1

Le site *NcoI* situé entre les bases 1376 et 1381 de l'ADNc de MKLP-1, fut modifié par introduction d'une mutation silencieuse de la thymidine (1377 pb) en adénosine, en utilisant le kit de mutagenèse dirigée « QuikChange Site-Directed Mutagenesis » (Stratagene). Cette technique consiste en une amplification PCR du vecteur contenant l'ADNc, en utilisant des amorces porteuses de la mutation choisie. Le vecteur matrice est ensuite éliminé par une digestion enzymatique par la restrictase *DpnI* qui digère le plasmide original méthylés. Les amorces sont présentées dans le tableau 3.

2.1.2. Synthèse des fragments par PCR

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est une technique *in vitro* d'amplification spécifique des séquences d'ADN. Elle permet de synthétiser d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique, à partir d'une matrice nucléotidique contenant la séquence à amplifier. Cette méthode permet des polymérisations successives initiées *via* deux oligonucléotides dont les extrémités 3' pointent l'un vers l'autre. Ces amorces complémentaires à la matrice définissent alors les bornes de la séquence à amplifier.

Afin de faciliter l'insertion des produits PCR dans un vecteur d'expression, les amorces ont été conçues de façon à ajouter les sites de restriction *NcoI* et *XhoI*, respectivement aux extrémités 5' et 3' des séquences amplifiées (**tableau 3**).

2.1.3. Insertion dans un plasmide

Les fragments amplifiés, conçus pour être introduits dans les vecteurs d'expression, sont préalablement purifiés à partir des produits de réactions PCR avant d'être insérés dans leur plasmide.

a. Purification des produits PCR

L'isolation des fragments amplifiés se fait par électrophorèse des produits PCR dans un gel d'agarose préparatif. Les échantillons sont mélangés avec un tampon de charge (0.25% bleu de bromophenol, 0.25% xylène cyanol et 30% glycérol) afin d'être ensuite déposés dans un gel d'agarose (1% d'agarose polymérisé dans une solution de tampon TAE : 40 mM tris-base, 25 mM EDTA et 20 mM acétate). Les brins d'ADN étant uniformément chargés négativement, la vitesse de migration est alors fonction de la longueur de la chaîne nucléotidique. Les brins les plus courts étant les plus rapides à migrer vers la cathode.

Après migration et coloration du gel dans un bain de Bromure d'éthidium (BET), les populations d'ADN apparaissent sous forme de bande visible sous lumière UV. Les bandes contenant les fragments d'intérêt sont alors excisées à l'aide d'un scalpel. Le contenu d'ADN est ensuite extrait de l'agarose avec le kit de purification « GeneClean Spin Kit ». La carotte

de gel est dissoute dans une solution de NaI à 55°C puis est filtrée sur une matrice de silice retenant les brins d'ADN. Les fragments purifiés sont élués dans l'eau après lavage de la résine à l'éthanol.

Tableau 3 : Séquences des oligonucléotides utilisés lors des clonages de MKLP-1 et de MgcRacGAP. Les sites de restriction insérés sont surlignés, et la mutation de la thymidine 1377 en adénosine, ainsi que la séquence correspondant à la boucle L6 de Kif5B sont indiquées en rouge.

Noms des oligonucléotides	Séquences
MKLP1_mutation_A1377->T Sens	GAGATACAGAAACCAGCCACGAGGTCCAGTTGG
MKLP1_mutation_A1377->T antisens	CCAACCTGGACCTCGTGGCTGGTTTCTGTATCAC
MKLP1_mutation_Insertion_Kpn1 Sens	CATATATGATCTATTGGAAGAGGTACCGTTTGATCCATAAAAC
MKLP1_mutation_Insertion_Kpn1 antisens	GTTTTATGGGATCAAACGGTACCTCTTCCAATAGATCATATATG
MKLP1_mutation_Insertion_Sac2 Sens	GAAGGAGGGCTGCTTCCGCGGTGTTTGGACATGATCTT
MKLP1_mutation_Insertion_Sac2 antisens	AAGATCATGTCCAAACACCGCGGAAGCAGCCCTCCTTC
MKLP1_start_1	AAGAAAAAAAAAGCCATGGAGTCAGCGAGAGCT
MKLP1_start_26	ACGAACCTTAAAGCCATGGTTGGGGTATAC
MKLP1_start_532	TGTTACAAGAATTTGCCATGGCTGTTTAAAGTAAA
MKLP1_start_583	AGAGAAAACAACCTACCATGGATGAGGAAGATAAAC
MKLP1_start_622	AAGGCATGGTGACAGCCATGGCAATGAAGTGGGAGA
MKLP1_end_435	AGGCTTTGCTACCTCGAGTTCTTGAGTCAC
MKLP1_end_530	TTCTTTACTTAAAACTCGAGGTCAAATCTTGTA
MKLP1_end_565	TCAATCTTATATTCTAACTCGAGGTTTTCTTTTCCA
MKLP1_end_621	TTCTTTCTCCCACTTCTCGAGCGTTCTGTACCA
MKLP1_end_857	TCAGTACTGGGACTGTCTCGAGTGGCTTTTTGCGCTT
MKLP1_L6-KHC_insert_sens	GGTGTGGACATGATCTTTAACAGTATAACTCCATGGATGAAA ATAGTGTCTATGGTGTATTTGTCTCTTATATTGAAATATATAATA ATTACATATATGATCTATTGGAAGAGGTAC
MKLP1_L6-KHC_insert_antisens	CTCTTCCAATAGATCATATATGTAATTATTATATATTTCAATATA AGAGACAAATACCCATAGACACTATTTTCATCCATGGAGTATAT ACTGTTAAAGATCATGTCCAAACACCGC
MgcRacGAP_start_1	GAGCTAAAGAACCATGGATACTATGATGCT
MgcRacGAP_start_110	TTCGAGAGATGCCCATGGGTGACACATCTG
MgcRacGAP_start_363	AGACTTCTCCCATGGTCCCCTCCATTGTTG
MgcRacGAP_end_107_pET-28	AGATGTGTCACACTCGAGCATCTCTCGAAT
MgcRacGAP_end_537_pET-28	CTGACTCCAATACTCGAGAGGCAAGGAAAG
MgcRacGAP_end_632_pET-28	GATGTGACTTCACTCGAGCATTGGAGAAGC
MgcRacGAP_end_107_pET-M-vectors	ATGTGTCACACTCGAGTCACTCTCGAATCA
MgcRacGAP_end_537_pET-M-vectors	ACTCCAATACTCGAGTCACAAGGAAAGCAG
MgcRacGAP_end_632_pET-M-vectors	ATGTGACTTCACTCGAGTCATGGAGAAGCA

b. Insertion des fragments d'intérêt

Afin de permettre la ligation entre le plasmide et l'insert contenant des extrémités compatibles, il est nécessaire de digérer le fragment précédemment purifiés, sur les deux sites de restrictions volontairement ajoutés dans le design des amorces PCR. Cette digestion façonne les extrémités cohésives complémentaires de l'insert et du vecteur.

Après la digestion enzymatique avec les restrictases *NcoI* et *XhoI*, les fragments digérés doivent une fois de plus être purifiés afin d'éliminer les enzymes de restriction et les petits brins d'ADN clivés. Cette fois encore cette séparation est réalisée avec le « GeneClean Spin Kit », en appliquant le produit de la digestion directement sur la résine de silice.

L'insert est ensuite ligué avec le plasmide préalablement linéarisé au niveau du site de clonage multiple (MCS) par digestion enzymatique *NcoI* et *XhoI*. Ces enzymes coupant de manière à créer des extrémités cohésives, l'insert ne peut se lier au plasmide que dans la bonne orientation. La liaison covalente entre l'insert et le vecteur d'expression est alors permise par l'activité d'une enzyme, la ligase (Rapid DNA Ligation Kit, Roche). Elle catalyse, en présence d'ATP, la formation d'une liaison phosphodiester entre le phosphate α d'une extrémité 5' et l'hydroxyle γ d'une extrémité 3'.

Pour amplifier et isoler les plasmides re-circularisés, les produits de ligation sont introduit par choc thermique dans des bactéries compétentes *E. coli XL10* (Stratagene)

c. La transformation bactérienne

Au court de cette étape, un plasmide circularisé peut être intégré au cytoplasme d'une bactérie et s'y répliquer. Après transformation, les cellules sont étalées sur une gélose LB supplémentées à 50 $\mu\text{g/ml}$ en kanamycine (pET-28a, pET-M30) ou 0.1 mg/ml ampicilline (pET-M20). Une dizaine de colonies (clones), obtenus après 12 heures d'incubations à 37°C, seront remis en culture pour amplifier et purifier leur plasmide (Miniprep Qiagen). Ils seront ensuite contrôlés par doubles digestions *XhoI* et *NcoI* et migration électrophorétique, afin de s'assurer l'obtention de clones positifs.

La migration électrophorétique des produits de restriction permettra alors l'appréciation de la présence du vecteur et de l'insert. Les clones sélectionnés seront ensuite vérifiés par

séquençage nucléotidique (entreprise Génome Express) pour s'assurer de la pérennité de la région codante, parfois altérée par des mutations accidentelles survenant lors de l'amplification PCR.

2.1.4. Mutation de la boucle L6 de MKLP-1

La boucle L6 de MKLP-1 particulièrement longue (80 acides aminés) chez les kinésines de la sous-famille 6, est une caractéristique unique à cette sous-famille. Afin de remplacer cette boucle de MKLP-1 par la boucle équivalente de la kinésine conventionnelle humaine (Kif5B), deux sites de restriction uniques sont insérés aux bornes de celle-ci par mutagenèse dirigée. Les sites *KpnI* et *SacII* ont ainsi été respectivement implémentés en amont et en aval par introduction de mutations silencieuses par mutagenèse dirigée (QuikChange Site-Directed Mutagenesis). La séquence codante de la boucle L6 est ensuite retirée par double restriction *KpnI* / *sacII*, puis la séquence de la boucle L6 de Kif5B y est substituée. L'insert utilisé comme porteur de la mutation de la boucle L6 de Kif5B, a été obtenu en utilisant deux oligonucléotides complémentaires d'une centaine de bases, contenant la séquence de la boucle 6 de KIF5B. Ces oligonucléotides ont été obtenus par synthèse nucléotidique (entreprise MWG) (**tableau 3**).

2.2. Surexpression et purification des protéines

2.2.1. Vecteurs d'expression de type pET

Les clonages ont été réalisés dans des vecteurs d'expression de type pET, compatibles à l'expression de protéines recombinantes dans un système bactérien *E. coli* adapté. Les plasmides pET ont été développés par Studier (Studier et Moffatt, 1986) pour permettre une forte production sélective de protéines d'intérêt dans des souches bactériennes spécialement conçues. Ils offrent une possibilité de contrôle sur le déclenchement de l'expression *via* une séquence de régulation inductible couplée à un promoteur fort (T7).

Un vecteur pET contient donc un promoteur T7 couplé à l'opéron LacO et un terminateur T7 aux bornes de la séquence d'intérêt, ainsi qu'un gène de résistance à un antibiotique pour maintenir le plasmide par le biais d'une pression de sélection. Le vecteur pET contiendra également le gène LacI exprimant un répresseur inductible du promoteur T7 *via* la séquence LacO.

La souche bactérienne utilisée pour l'expression est génétiquement modifiée par l'intégration dans son génome d'un gène codant pour la polymérase T7, lui aussi régulé par le système inspiré de l'opéron lactose (LacO, LacI) usité dans le déclenchement de la transcription du gène d'intérêt. Le répresseur synthétisé à partir du gène LacI, se fixe sur la séquence régulatrice LacO du promoteur T7 et bloque la transcription de la séquence codante sous sa dépendance. L'expression de la protéine d'intérêt va être induite par ajout d'IPTG : c'est la phase d'induction. Elle est provoquée lors de la période exponentielle de croissance bactérienne ($DO_{600nm} = 0.7$). L'IPTG provoque un changement conformationnel du répresseur lacI, alors incapable d'interagir avec la séquence régulatrice LacO. Dès lors, l'expression de la polymérase T7 est permise et autorise la transcription du gène d'intérêt.

Pour faciliter la purification de la protéine, les vecteurs utilisés disposent d'une séquence codant pour une étiquette poly-histidine fusionnée à la protéine (sur l'extrémité N ou C terminale selon le vecteur utilisé). De même, afin d'améliorer la solubilité des protéines eucaryotes synthétisées dans ce système procaryote, les vecteurs pET-M20 et pET-M30 permettent l'ajout respectif en position N-terminal, de la thyorédoxine (TRX) ou de la glutathion S-transférase (GST). Ces deux étiquettes TRX et GST sont clivables *via* un site de coupure reconnu par la protéase TEV (protéase du virus de tabac).

2.2.2. Test de surexpression

Les tests de surexpression ont été réalisés sur différentes souches bactériennes modifiées pour l'expression des protéines recombinantes : *BL21 (DE3) pLysS*, *BL21 (DE3) star* et *BL21 (DE3) codon plus*. Après transformation des plasmides d'intérêt dans des souches d'expression bactériennes, huit colonies sont piquées et inoculées sous agitation dans 5 ml de milieu LB supplémentés à 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamycine ou 0.1 mg/ml d'ampicilline, à 37°C. Ces cultures bactériennes sont induites à une DO_{600nm} de 0.7 avec 0.5 mM d'IPTG et

laissées une nuit à 20°C sous agitation. Les cultures sont ensuite centrifugées après la constitution d'un souchier conservé à -80°C, en prélevant 800 µl de culture avec 200 µl de glycérol stérilisé.

Les culots bactériens sont remis en suspension et incubés 20 minutes à 4°C, dans 1 ml de tampon A (20 mM Pipes, 200mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂) contenant 10 mM de PMSF et 2 mg/ml de lysozyme. La lyse est achevée avec cinq cycles de congélations/décongélations et l'ADN finalement digéré avec l'ajout de 5 µl de *DNAseI* à 10 mg/ml. La fraction soluble est ensuite séparée des éléments insolubles par une centrifugation à 13000 rpm pendant 30 minutes.

L'expression est vérifiée par Western-Blot en déposant un extrait de chaque surnageant et culot dans un gel SDS-PAGE 12%. Après migration (150 Volts, 35 mA), le transfert du gel vers une membrane de nitrocellulose est réalisé pendant 2 heures à 4°C (200 Volts, 400 mA). Les membranes de transfert sont incubées une nuit à 4°C sous agitation dans un tampon TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 150 mM) enrichi avec 30% de protéines de lait. Après trois lavages de 10 minutes avec un tampon TBS, le marquage des protéines est réalisé. Pour ce faire, les membranes sont incubées 5 minutes avec du NiNTA couplés à la peroxydase (Ni-NTA HRP Conjugate, Qiagen), fortement affiné pour les étiquettes poly-histidines. La révélation est obtenue après trois lavages au TBS-TWEEN (tampon TBS avec 0.1% de TWEEN 20), par l'activation de la peroxydase avec l'ajout de son substrat, le Diaminobenzidine (kit Sigma, fast 3,3' diaminobenzidine tablet set).

2.2.3. Purification des protéines recombinantes

a. Cultures cellulaires et purifications

Les pré-cultures sont réalisées, à partir des souchiers d'expressions, dans 100 ml de milieu LB supplémentés avec 50 µg/ml de kanamycine ou 0.1 mg/ml ampicilline (selon le vecteur pET). Les bactéries sont incubées sous agitation une nuit à 37°C, puis réparties dans trois litres de milieu 2xYT (Difco) supplémentés en antibiotiques. Les cultures sont laissées sous agitation à 37°C puis induites avec 0.5 mM d'IPTG lorsque la DO_{600nm} atteint 0.7. L'induction de l'expression des protéines recombinantes est perpétrée à 16°C sous agitation pendant 16 heures, puis les bactéries récoltées par centrifugation à 7000 rcf pendant 15

minutes. Les culots bactériens sont repris dans 40 ml de tampon A, incrémentés avec 10 mM de PMSF, 0.25 mg/ml de lysozyme et 0.25 μ g/ml de *DNAseI*. Après une incubation de 15 minutes sous agitation à 4°C, la suspension bactérienne est lysée suite à deux passages dans une presse de French. Le lysat est centrifugé à 25000 rcf pendant 45 minutes afin de séparer la fraction soluble de la fraction insoluble.

La purification est réalisée à 4°C avec une FPLC ÄKTA (Amersham Bioscience) à partir de la fraction soluble. Le surnageant est chargé sur une colonne de nickel agarose (1 ml HisTrap, Amersham Pharmacia Biotech) préalablement équilibrée avec 5 volumes de colonne de Tampon A. Les protéines recombinantes sont éluées par des pas croissants d'imidazole à un débit de 1 ml/min et récoltées dans un système collecteur Frac-950 (Amersham Bioscience). Pour améliorer la pureté des protéines surexprimées, une seconde étape de gel-filtration sur une colonne Superose12 est réalisée à un débit de 0.3 ml/min après concentration dans un filtre à centrifuger Amicon (Millipore). L'éluion et la pureté des protéines d'intérêt sont appréciées sur gel SDS-PAGE, séquençage N-terminal et spectrométrie de masse. La concentration est déterminée par dosage colorimétrique de Bradford (Bradford, 1976). La protéine pure ainsi purifiée est alors utilisée directement pour effectuer des tests enzymatiques, des caractérisations biochimiques où des essais de cristallogénèse, puis des aliquots de protéines sont congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

b. Expériences de dénaturation/renaturation

Les fragments protéiques de McgRacGAP se sont révélés faiblement solubles ou totalement insolubles selon les constructions exprimées. Des expériences de dénaturation / renaturation ont donc été entrepris à partir de corps d'inclusion.

Purification des corps d'inclusion :

La protéine est produite à partir de 1 litre de culture de bactéries transformées, comme décrit précédemment. Les bactéries sont récoltées par centrifugations à 7000 rcf pendant 10 minutes, puis lysées par presse de French dans les mêmes conditions précédentes. Le lysat bactérien est centrifugé à 8000 rcf pendant 15 minutes pour purifier les corps d'inclusions. Le culot ainsi obtenu est alors re-suspendu dans 25 ml de tampon A auquel est ajouté 0.1% de triton X100. Après solubilisation des corps d'inclusions, la suspension est à nouveau centrifugée à 8000 rcf

pendant 15 minutes et re-suspendue dans 25 ml de tampon A. Cette étape de lavage des corps d'inclusion est effectuée trois fois pour éliminer les contaminants. Le culot protéique est finalement solubilisé et dénaturé dans 10 ml de tampon A supplémenté avec 6 M d'urée.

Renaturation par dilution rapide :

La protéine dénaturée dans l'urée est ajustée pour une concentration finale de 10 mg/ml. La renaturation est réalisée par dilution rapide en ajoutant, goutte-à-goutte, la solution de protéine dans un tampon de renaturation sous agitation (50 mM Pipes, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ et 500 mM NaCl). La concentration protéique finale obtenue après dilution est de 0.1 mg/ml.

Renaturation par dialyse:

La protéine dénaturée est ajustée pour une concentration finale de 0.1 mg/ml. La renaturation est réalisée par dilution lente de l'urée. Cette opération est réalisée en dialysant le mélange de protéines dénaturées dans un boudin de dialyse, face à un tampon de renaturation sans urée. La dialyse est réalisée sur la nuit, à 4°C.

Renaturation sur colonne :

Le mélange de protéines dénaturées est purifié par FPLC ÄKTA (Amersham Bioscience) *via* une colonne nickel agarose (1 ml HisTrap, Amersham Pharmacia Biotech). La protéine d'intérêt étant fusionnée à une étiquette poly-histidines, elle est alors retenue dans la colonne. L'urée est ensuite éliminée par le biais d'un gradient décroissant d'urée, de 6 M à 0 M, avec 1.5 litre de phase mobile éluée avec un débit de 1 ml/min. La protéine est ensuite purifiée par un gradient isocratique d'imidazole.

2.3. Enzymologie

2.3.1. Dosage de l'activité ATPasique par test couplé

Pour effectuer les mesures d'activité ATPasique de la kinésine MKLP-1, j'ai utilisé un test couplé mis au point par le Pr. David D. Hackney (Hackney et Jiang, 2001) (**figure 20**). La pyruvate kinase (PK) assure la régénération de l'ATP hydrolysé en ADP et Pi par MKLP-1, en puisant l'énergie libre nécessaire à cette réaction dans la transformation du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate. Le pyruvate indirectement formé à chaque cycle catalytique de la kinésine est alors le substrat de la lactate déshydrogénase qui réalise une

réaction d'oxydoréduction impliquant le couple NADH, H^+ comme co-enzyme. L'évolution de la réaction est suivie en observant au cours du temps, la diminution de la densité optique à 340 nm correspondant à l'absorption de la forme réduite NADH, H^+ .

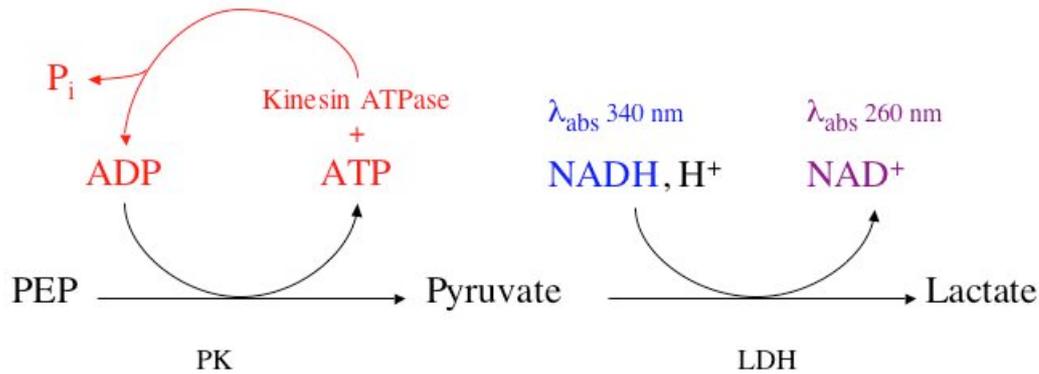


Figure 20 : Schéma réactionnel du test enzymatique couplé. En catalysant l'ATP, la kinésine libère de l'ADP, alors substrat de la pyruvate kinase (PK). Il en résultera une consommation de NADH par la lactate déshydrogénase (LDH) à chaque cycle catalytique de l'ATPase. La vitesse enzymatique de la kinésine est indirectement observée en déterminant la vitesse de disparition du NADH, H^+ à 340 nm.

Les cinétiques enzymatiques sont réalisées dans un tampon A25 (25 mM ACES/KOH, 2 mM acétate d'ammonium, 2 mM K-EGTA, 0.1 mM K-EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol, à un de pH 6.9) contenant 2 mM PEP, 0.25 mM NADH, H^+ , 5 $\mu\text{g/ml}$ pyruvate kinase et 3 $\mu\text{g/ml}$ de lactate déshydrogénase. Les concentrations en ATP et NaCl seront fixées arbitrairement selon les besoins de l'expérience ainsi que la présence ou non de microtubules stabilisés par taxol dans le cas de mesures d'activités stimulées.

Les essais sont réalisés en plaques 96 puits avec des volumes finaux de 100 μl . La pente (diminution $\text{DO}_{340\text{nm}}$) correspondant à la vitesse de catalyse de l'ATP en $\Delta\text{A}/\text{min}$ est traduite en nombre d'ATP consommés par seconde (s^{-1}) en appliquant la formule suivante :

$$\text{Vitesse (s}^{-1}\text{)} = \Delta\text{A}/\text{min} * 2 / [\epsilon_{\text{NADH}, \text{H}^+} * 60 * C_{\text{enzyme}}] \quad \text{Eq 1}$$

Avec, $\epsilon_{\text{NADH,H}^+}$ le coefficient d'extinction molaire du NADH,H⁺ (6220 $\Delta A/\text{mol}/\text{cm}$), $\Delta A/\text{min}$ la variation d'absorbance à 340 nm par minute et C_{enzyme} la concentration molaire de kinésine dans le test enzymatique. La composante **2** est un facteur correctif permettant de considérer le trajet optique dans les cuves. Les mesures enzymatiques sont réalisées avec un spectromètre 96 puits Sunrise (TECAN, Maennedorf, Switzerland) contrôlé par ordinateur *via* le logiciel Magellan.

2.3.2. Détermination des constantes cinétiques

La kinésine MKLP-1 est une enzyme de type michaelienne dont le comportement cinétique obéit à l'équation de Henry-Michaelis-Menten (**Eq. 2**). Cette formule décrit la vitesse de catalyse de l'enzyme en nombre d'ATP transformés par seconde (s^{-1}) en fonction de la concentration en substrat, d'un paramètre d'affinité de l'enzyme pour son substrat et de la vitesse maximale de l'enzyme :

$$\text{Vitesse } (\text{s}^{-1}) = \frac{[C_{\text{substrat}}] * k_{\text{cat}}}{([C_{\text{substrat}}] + K_m)} \quad \text{Eq. 2}$$

Pour les cinétiques sans microtubules (activité basale), les variables V et C_{substrat} sont respectivement : l'activité ATPasique (en s^{-1}) et la concentration en substrat (ATP). Le paramètre k_{cat} représente la vitesse maximale de l'enzyme et le K_m (ou constante de Michaelis) rend compte de l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Le K_m s'exprime en molaire et caractérise la concentration en substrat nécessaire pour une vitesse égale à $k_{\text{cat}}/2$. Plus le K_m est faible, plus l'affinité de l'enzyme est grande pour son substrat. La catalyse des kinésines est stimulée en présence de microtubules. Les caractéristiques de la forme stimulée de l'enzyme (l'affinité et la vitesse maximale) peuvent alors être obtenus en exécutant les tests en présence d'une concentration saturante en microtubules.

La stimulation de l'activité ATPasique par les microtubules (MT) est modélisée par l'équation d'Henry-Michaelis-Menten (**Eq. 2**), où la vitesse catalytique est alors corrélée à la concentration de tubulines (pour une quantité fixe en ATP) (**Eq. 3**). Les variables V et $[MT]$ rendent alors compte de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP (en s^{-1}) et de la concentration de

tubuline (microtubules stabilisés par taxol). Les paramètres k_{cat} et $K_{0.5(MT)}$ sont la vitesse maximale stimulée et l'affinité de l'enzyme pour les microtubules.

$$\text{Vitesse (s}^{-1}\text{)} = \frac{[\text{MT}] * k_{cat}}{([\text{MT}] + K_{0.5(MT)})} \quad \text{Eq. 3}$$

2.3.3. Criblage des chimiothéques

Afin de découvrir des nouveaux inhibiteurs de MKLP-1, les chimiothéques fournies par l'Institut de Chimie et des Substances Naturelles (ICSN), l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) et par le National Cancer Institute (NCI/NIH), ont été criblées pour l'activité ATPasique de la construction MKLP-1₂₋₄₅₇ (40 nM) en présence de 2 μM de tubuline et 1 mM d'ATP (activité stimulée). Une partie des criblages a été réalisée sur la mesure des activités basales de MKLP-1₂₋₄₅₇; dans ce cas là, les cinétiques ont été effectuées en absence de microtubules et avec 3 μM d'enzyme (MKLP-1₂₋₄₅₇). Le criblage est réalisé en effectuant une mesure classique de l'activité de MKLP-1 en présence d'un des composés de la chimiothéque. Les cinétiques sont mesurées dans le test couplé (**figure 20**) constitué de la pyruvate kinase et de la lactate déshydrogénase (25 mMACES/KOH, pH 6.9, 2 mM acétate d'ammonium, 2 mM K-EGTA, 0.1 mM K-EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol, 2 mM PEP, 0.25 mM NADH,H⁺, 5 $\mu\text{g/ml}$ pyruvate kinase et 3 $\mu\text{g/ml}$ de lactate déshydrogénase) supplémenté avec 50 mM NaCl, 1 mM ATP et 50 μM d'une des molécules de la chimiothéque. Huit réactions contrôles (sans inhibiteur) sont simultanément suivies lors des criblages sur plaques 96 puits. La réaction est initiée avec l'ajout de la kinésines dans un volume final de 100 μl .

Le criblage étant réalisé dans un test couplé impliquant la PK et la LDH, les molécules inhibitrices sont ensuite re-testées *via* un test d'activité non couplé (direct), afin de s'assurer que les inhibiteurs soient réellement actifs contre la kinésine et non contre les composants du test. Cette mesure directe de l'activité de MKLP-1 se concrétise par la mesure des quantités de phosphate inorganique (P_i) libérés lors de l'hydrolyse de l'ATP. Pour ce faire, j'ai utilisé le cytophos (CytoPhos Phosphate Assay Biochem Kit, Cytoskeleton), un réactif sensible au P_i et permettant son dosage colorimétrique à 650 nm. En raison de la sensibilité de ce réactif, la

protéine est dessalée avant l'expérience sur une colonne de gel-filtration P6 (Micro Bio-Spin, Amersham Pharma Biotech) pour éliminer toutes traces de P_i provenant de l'activité basale résiduelle. Les cinétiques sont réalisées dans un tampon A25 supplémenté avec 50 mM NaCl, 1 mM ATP et 50 μ M d'une molécule de la chimiothèque. La réaction est initiée à température ambiante avec l'ajout de la kinésine dans un volume réactionnel final de 300 μ l. Un aliquot de 30 μ l est prélevé toutes les 10 minutes puis mélangé à 70 μ l de réactif CytoPhos pour estimer la quantité de P_i libéré. La mesure colorimétrique s'effectue après 10 minutes d'incubation de l'aliquot avec le réactif CytoPhos.

2.4. Expérience de liaison aux microtubules

Des expériences de co-précipitation ont été mises en place afin de quantifier la fixation de la « queue » de MKLP-1 et de la protéine MgcRacGAP avec les microtubules. La méthode consiste à mélanger des quantités croissantes de protéines en présence de microtubules stabilisés (avec taxol), pour mesurer leur capacité d'interaction par centrifugation et sédimentation des microtubules. La centrifugation permet alors de séparer les protéines associées aux microtubules et la fraction protéique libre restée dans le surnageant. Une analyse quantitative est ensuite réalisée sur gel SDS-PAGE, par intégration et numérisation des intensités des protéines colorées au bleu de Coomassie (brillant blue R250).

L'expérience est réalisée à l'équilibre après 15 minutes d'incubation. L'appréciation des populations de protéines liées ou non liées nous permet de déterminer l'affinité de celle-ci pour les microtubules, en établissant la constante de dissociation du complexe (K_d).

Les co-sédimentations ont été préparées avec une gamme de concentration protéique allant de 0 à 25 μ M, réalisées dans un volume final de 100 μ l de tampon A25, en présence de 2 μ M de taxol. Les protéines sont mélangées à 2 μ M de tubuline (préalablement polymérisée pendant 15 heures en présence de taxol) supplémentées selon l'expérience de 4 mM de nucléotides (AMP-PNP, ou ADP) ou de 50 à 400 mM NaCl. Une réaction de contrôle est réalisée sans microtubules. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, les mélanges sont centrifugés à 80000 rcf dans un rotor TLA100.X (Beckman) pendant 20 minutes et à 22°C. Les culots et les surnageants sont analysés par SDS-PAGE 12% et colorés avec du bleu de Coomassie. Le dosage des populations libres et liées aux microtubules est déterminé avec le logiciel ImageJ, en intégrant l'intensité des bandes du gel. Une gamme étalon interne est

utilisée pour chaque gel. La valeur du K_d est obtenue en traçant sur un graphe l'évolution de protéines libres en fonction de la quantité de protéines liées, dont la courbe est régie par l'équation quadratique suivante (**Eq. 4**) :

$$[L_{\text{lié}}] = [L_{\text{libre}}] * B_{\text{max}} / ([L_{\text{libre}}] + K_d) \quad \text{Eq. 4}$$

$$[L_{\text{lié}}] / [L_{\text{libre}}] = (B_{\text{max}} / K_d) - (1 / K_d) * [L_{\text{lié}}] \quad \text{Eq. 5}$$

Avec respectivement les variables $[L_{\text{libre}}]$ et $[L_{\text{lié}}]$ représentant la concentration en protéines libres et fixées aux microtubules. Les paramètres B_{max} et K_d indiquent respectivement le nombre de sites d'interactions maximums (en molaire) et la constante de dissociation du complexe protéine/tubuline. L'équation 5 est utilisée pour la représentation de Scatchard (Rosenthal, 1967), où l'on trace le rapport $[L_{\text{lié}}]$ et $[L_{\text{libre}}]$ en fonction de la fraction $[L_{\text{lié}}]$. Cette représentation est la linéarisation de l'évolution des deux populations modélisée par l'équation 4.

2.5. Essais de cristallisation

La cristallographie des rayons X est une technique de choix utilisée pour l'étude structurale des macromolécules. Nécessitant l'obtention de cristaux, la cristallogenèse est une étape limitante quant à la réussite de cette méthodologie. Afin de résoudre les structures atomiques de MKLP-1 et de MgcRacGAP, de multiples essais de cristallogenèse ont été réalisés avec les différentes constructions protéiques clonées. La connaissance de la physico-chimie des macromolécules n'est pas suffisante pour établir une méthode rationnelle de cristallogenèse, qui reste pour une grande part très empirique.

2.5.1. Principe de la cristallographie

La cristallogenèse est le passage pour une molécule d'un état désordonné à un état ordonné : le cristal. En jouant sur la solubilité des macromolécules, on peut contraindre à la formation de cristaux. De nombreux paramètres interviennent dans ce phénomène tels que le pH, la température, la force ionique, la pureté, *etc.* Ainsi, au cours de la cristallisation, la concentration de la macromolécule va augmenter jusqu'à atteindre un état de sursaturation favorable à l'obtention de cristaux. Pour chaque molécule correspondra un diagramme de phase spécifique, rendant compte des transitions de phases en fonction de la concentration de celle-ci et des conditions de précipitants (**figure 21**).

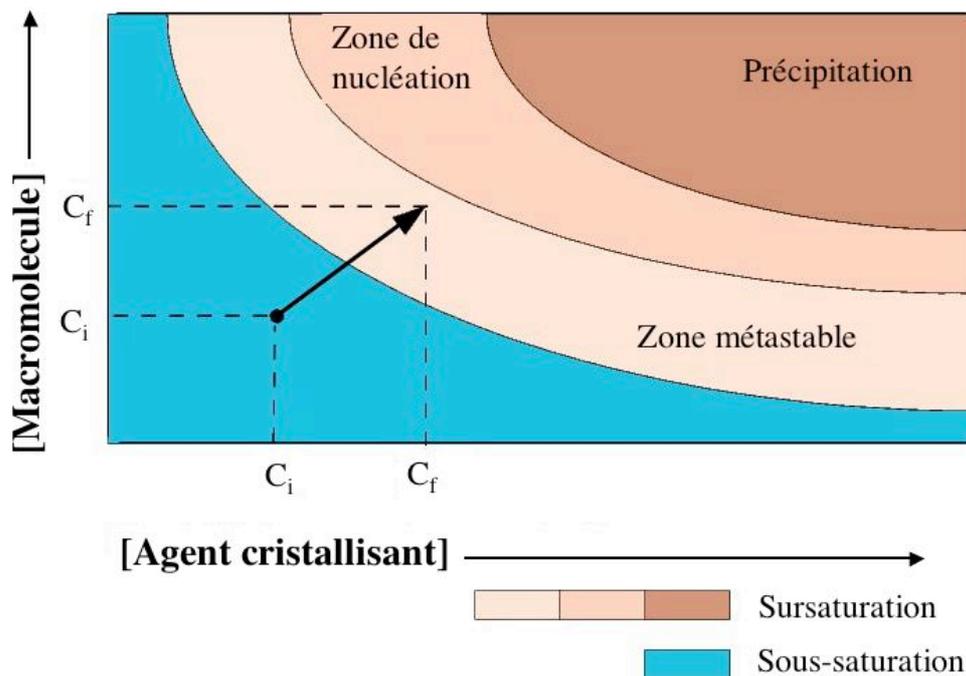


Figure 21 : Représentation schématique d'un diagramme de phase de protéine. La zone de sursaturation est décomposée en trois sous régions : une zone de précipitation amorphe, une région favorable à la nucléation des cristaux et une zone métastable favorisant la croissance cristalline. L'équilibre s'établit entre la goutte et le réservoir par diffusion des espèces volatiles jusqu'à ce que la tension de vapeur soit la même dans la goutte et dans le réservoir. Au cours de l'évolution de ce système vers l'équilibre, la concentration en protéine et en agent précipitant va croître au sein de la goutte et parcourir le diagramme de phase : c'est le chemin de cristallisation (indiqué par une flèche).

2.5.2. Essais de cristallogenèse

Les essais de cristallogenèse sont réalisés dans des plaques 96 puits en gouttes assises (Nextal QIA2 μ plate, Qiagen) en utilisant une large gamme de 768 conditions précipitantes (kits de cristallisation protéique fournis par Hampton Research et Nextal/Qiagen). De plus, au sein du laboratoire nous avons élaboré 96 conditions supplémentaires, spécifiques à la cristallisation des kinésines sur la base des conditions de cristallisations de domaines moteurs recensés dans la Protein Data Bank (PDB).

Au sein d'une même chambre isolée hermétiquement, un réservoir de solution d'agents précipitants (100 μ l) sera associé à une goutte assise constituée d'un mélange de solution protéique et de précipitants (0.1 μ l + 0.1 μ l). Cette méthode de cristallisation est appelée diffusion de vapeur, car la goutte et le réservoir vont tendre à s'équilibrer par échange des espèces volatiles. La goutte étant plus diluée que le réservoir, elle va se concentrer jusqu'à atteindre l'équilibre. Au cours de cette cinétique de diffusion, la concentration protéique va croître et parcourir le diagramme de phase pour arriver potentiellement à un état favorable à la cristallisation (**Figure 21**). Les conditions de cristallisation commerciales et celles spécifiquement conçues pour le criblage des kinésines, ont permis le criblage de 864 conditions d'agents précipitants différentes, testées avec des gammes variables en protéine allant de 3 à 40 mg/ml et équilibrées à 4 et 19°C. Le criblage des conditions initiales a été effectué en gouttes assises, *via* les robots de cristallisation des plateformes de cristallogenèse de l'IBS (robot TECAN, goutte de 1 μ l) et de l'EMBL (robot cartesian, goutte de 0.1 μ l). De plus, plusieurs essais manuels de cristallisation ont été réalisés autour de certaines conditions jugées comme intéressantes suite aux criblages automatisés. Ces essais ont été réalisés dans des plaques de cristallisation de 24 puits (VDX plate, Hampton Research) pour des gouttes suspendues composées de 1 μ l de solution précipitante et de 1 μ l de protéines.

Chapitre 3

RESULTATS

3.1. Caractérisation de MKLP-1 et MgcRacGAP

Les travaux de cette thèse portent essentiellement sur l'étude de la protéine MKLP-1 et sa partenaire MgcRacGAP. *In vivo*, elles forment toutes deux un complexe hétérotétramérique essentiel à l'évolution du cycle cellulaire, intervenant notamment au cours de la cytokinèse. La partie majeure des efforts employés fut dans le cadre d'un projet structural ciblant les deux protéines MKLP-1 et MgcRacGAP pour lesquelles j'ai pu sous-cloner de nombreuses constructions pour satisfaire l'obtention de fragments solubles et stables. Ce chapitre présente les différents fragments exprimés et caractérisés dans le but de leur cristallisation.

3.1.1. Les constructions clonées

Afin d'obtenir *in fine* le plus large éventail de domaines solubles, 15 fragments issus des gènes humains codant de MKLP-1 et de MgcRacGAP ont été sous-clonés dans les trois vecteurs pET-M20, pET-M30 et pET-28a, et 31 protéines chimériques furent exprimées. Les protéines d'intérêts ont été exprimées dans les trois souches bactériennes *BL21 (DE3) pLysS*, *BL21 (DE3) codon plus* et *BL21 (DE3) star*, pour cribler les meilleures conditions d'expression. Cette multitude de clonages (**figure 22**) est le fruit d'une stratégie visant la caractérisation fonctionnelle et structurale du « centralspindlin complex » dont la première étape a consisté à l'obtention de fragments stables et cristallisables de chacune des deux protéines sous leur forme libre ou complexée.

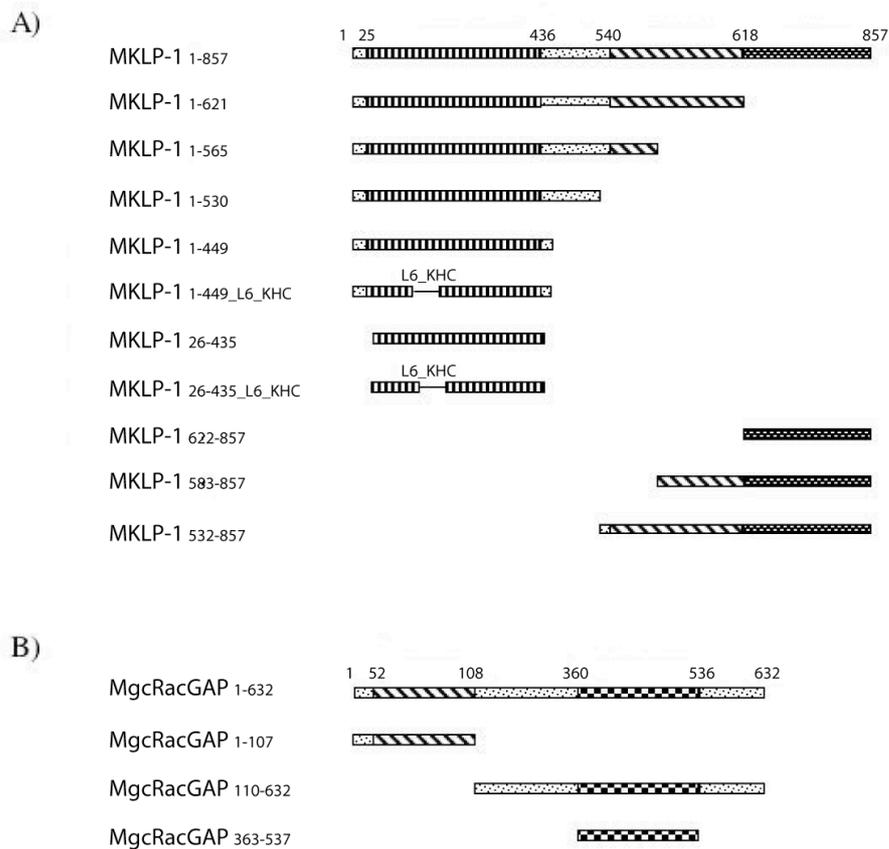


Figure 22 : Schéma des différentes constructions protéiques exprimées pour les deux protéines humaines MKLP-1 et MgcRacGAP. Chaque construction a été sous-clonée dans les vecteurs d'expressions pET-M20 (étiquette Glutathion S-Transferase, GST), pET-M30 (étiquette thiorédoxine, TRX) et pET-28a (étiquette poly-histidines) et exprimée dans les trois souches bactériennes *BL21 (DE3) pLysS*, *BL21 (DE3) codon plus* et *BL21 (DE3) star*. Les deux mutants MKLP-1_{1-449_L6_KHC} et MKLP-1_{26-435_L6_KHC} possèdent la boucle L6 de la kinésine conventionnelle humaine (KIF5B) en remplacement de leur boucle L6 native.

Afin d'exprimer chacun des domaines de MKLP-1 ou de MgcRacGAP séparément, j'ai recherché les délimitations de ces domaines en m'aidant d'outils informatiques (ClustalW, ESPript, Fold Index, COILS...), et des connaissances déjà établies sur ces protéines. Le « tronçonnage » des protéines en différents fragments est fréquemment utilisé en cristallographie pour limiter les régions ou extrémités jugées potentiellement flexibles et néfastes au processus de cristallogénèse.

Ainsi, la détermination des bornes du domaine moteur et de la région intermédiaire « cou » de MKLP-1 fut clairement identifiée à partir d'alignement de séquences avec les kinésines Kif5B, CENP-E et Eg5 dont les structures atomiques des domaines moteurs sont aujourd'hui résolues. Sur la base de la conservation structurale du repliement des domaines moteurs et l'alignement présenté à la figure 23, la tête catalytique humaine de la kinésine MKLP-1 apparaît donc sans ambiguïté entre les acides aminés 25 et 436 de MKLP-1.

Les domaines de dimérisation des protéines MKLP-1 et MgcRacGAP sont caractérisés par un enroulement en super-hélice. Ce type d'organisation peut être prédit par les programmes COILS et Paircoil2 accessible sur le portail Internet *ExpASY proteomics Tools* (Lupas et al., 1991 ; McDonnell et al., 2006). Ces prédictions probabilistes basées sur la reconnaissance de motifs sont généralement fiables et ont été éprouvées avec réussite sur des séquences de kinésines témoins à la structure déjà connue. Les domaines d'enroulement en super-hélice ont ainsi été prédits entre les acides aminés 540 et 618 pour MKLP-1 et entre les résidus 52 et 108 pour MgcRacGAP (**figure 24**).

À l'instar du cœur catalytique de MKLP-1, le domaine d'activation des protéines G (RacGAP) de MgcRacGAP a lui aussi été détecté par le biais d'un alignement de séquence avec la protéine RacGAP relevant d'une forte homologie entre les acides aminés 360 et 536 de MgcRacGAP.

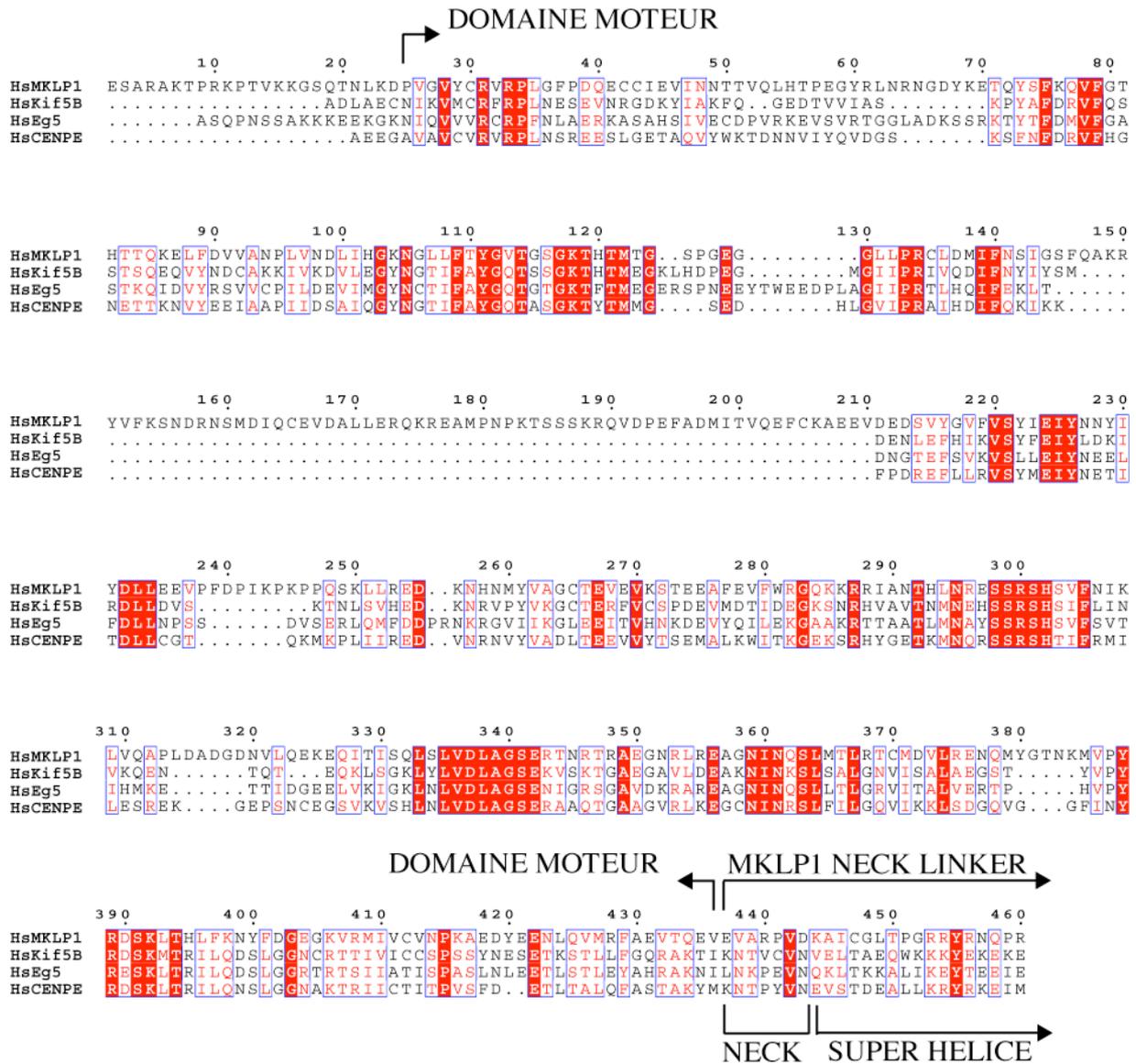


Figure 23 : Estimation des bornes du domaine moteur de MKLP-1. Alignement de séquences des trois domaines moteurs humains de KIF5B, d'Eg5 et de CENP-E avec MKLP-1. En blanc sur fond rouge sont indiqués les résidus conservés, et en rouge sur fond blanc les résidus aux propriétés similaires. Sont indiqués par des repères, les bornes des domaines moteurs déterminés à partir de l'étude structurale des trois kinésines humaines KIF5B, Eg5 et CENP-E (entrée PDB respective : 1MKJ, 2IEH et 1T5C). Par analogie, le domaine moteur de MKLP-1 se situerait entre les résidus 25 et 436. L'alignement est généré en utilisant ClustalW (Thompson et al., 1994) et visualisé avec le programme ESPrInt (Gouet et al., 1999).

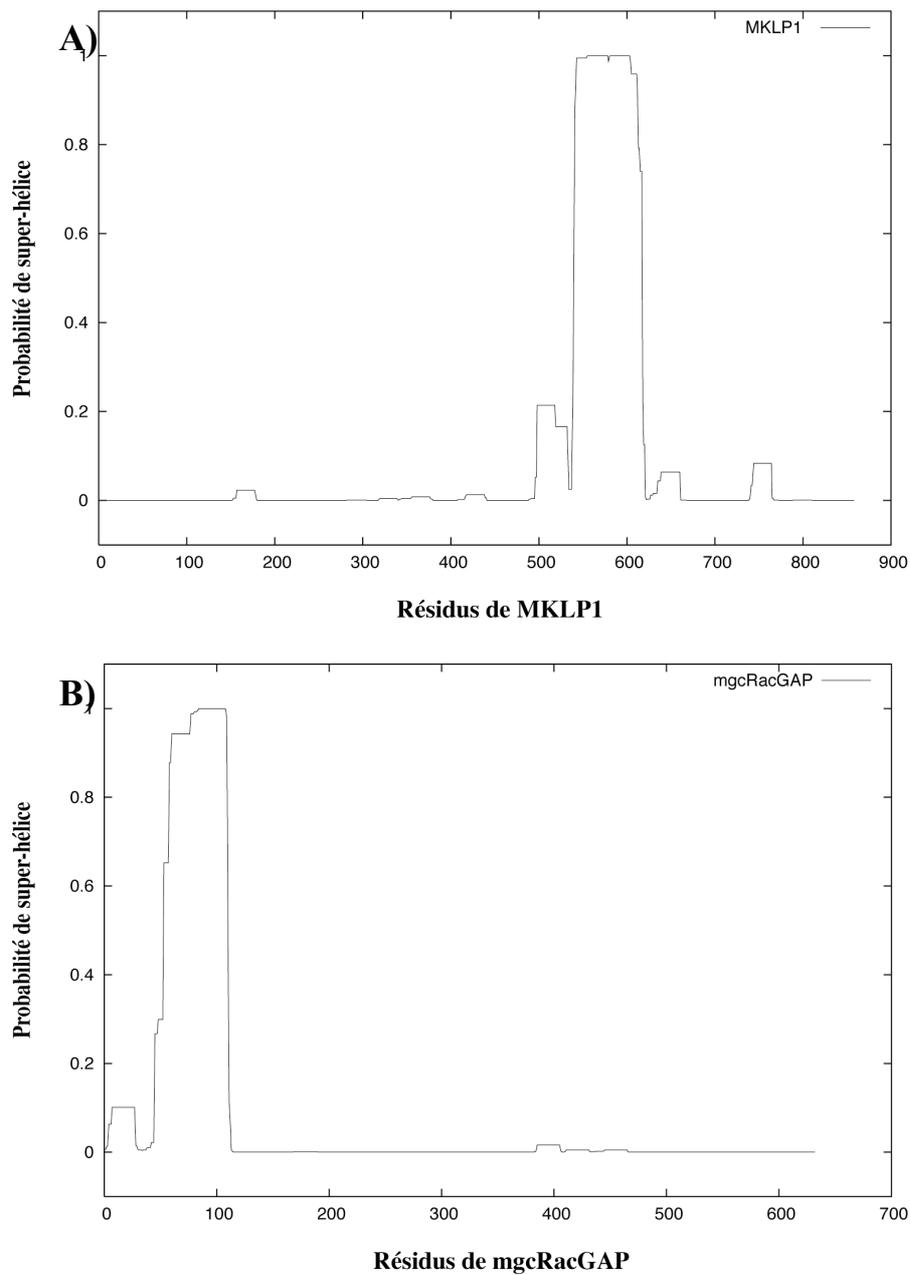


Figure 24 : Détermination des domaines de dimérisation en super-hélice de MKLP-1 (A) et de MgcRacGAP (B). Le programme COILS (Lupas et al., 1991) détermine une probabilité de repliement en enroulement d'hélices parallèles par comparaison de motifs et de séquences enregistrées dans une banque de données. Le domaine de dimérisation de la kinésine MKLP-1 s'étend des acides aminés 540 à 618, et des résidus 52 à 108 et pour MgcRacGAP.

3.1.2. Expressions des fragments de MKLP-1

À l'exception de la construction entière de MKLP-1 (MKLP-1₁₋₈₅₇), les différentes constructions clonées du domaine moteur sont surexprimés avec des rendements de purification de 15 à 20 milligrammes de protéines par litre de culture bactérienne, et de 0.5 à 2 mg/l pour les autres fragments protéiques (**tableau 4**). Néanmoins, comme l'indiquent les séquençages N-terminaux des constructions purifiées, le domaine moteur de MKLP-1 se révèle sensible à la protéolyse malgré l'utilisation d'anti-protéases (**tableau 4**). Les sites majeurs de cette dégradation sont tous localisés au niveau de la boucle L6, notamment au niveau des acides aminés 161, 163, 166 et 172. Les mutants de la boucle L6 possédant la boucle courte équivalente de Kif5B sont résistants à la protéolyse.

Dans le cadre d'une caractérisation biochimique préalable à des essais enzymologiques ou à des tests de cristallogénèse, j'ai étudié l'état d'oligomérisation des différentes constructions protéiques exprimées. Les états d'oligomérisation observés en solution par gel-filtration sont résumés dans le tableau 4. La prospection des états oligomériques a été réalisée par chromatographie d'exclusion sur des colonnes analytiques de type Sépharose-12 et Sépharose-6 préalablement calibrées. Déjà définie dans de précédentes publications, la protéine native s'organise en dimère via un enroulement en super-hélice entre les résidus 540 et 618 (Pavicic-Kaltenbrunner et al., 2007). Les volumes d'élutions observés par gel-filtration pour les fragments MKLP-1₂₆₋₄₃₅ et MKLP-1₁₋₄₄₉ ainsi que leurs mutants respectifs de la boucle L6 (MKLP-1_{26-435_L6_KHC} et MKLP-1_{1-449_L6_KHC}) indiquent que les domaines moteurs de MKLP-1 sont présents sous forme monomérique en solution. Les constructions munies en intégralité ou en partie de la région de dimérisation (MKLP-1₁₋₅₆₅, MKLP-1₁₋₆₂₁) s'agencent sous forme dimérique conformément aux études précédemment publiées (Pavicic-Kaltenbrunner et al., 2007). Les trois fragments contenant la région « queue », MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇, s'assemblent sous forme dimérique. Parmi ces trois fragments exprimés, MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ contiennent tous deux sur leurs extrémités N-terminales 86 et 35 résidus du domaine d'enroulement super-hélice. Il est à noter que le domaine d'interaction aux cargos (MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇) est lui aussi capable de s'auto-organiser en dimère sans le domaine central de dimérisation (**tableau 4**).

Tableau 4 : Analyse qualitative des constructions exprimées de MKLP-1 dans les vecteurs pET-28a (étiquette poly-histidine C-terminale) et pET-28a modifié (étiquette poly-histidine N-terminale). Les séquençages N-terminaux de chaque protéine furent effectués par dégradation d'Edman (Applied Biosystem gas-phase sequencer model 492) ou par spectrométrie de masse en tandem. La détermination des masses a été réalisée par spectrométrie de masse en mode electrospray (ESI) et les plasmides séquencés par l'entreprise *GenomeExpress*. Les états d'oligomérisation ont été déterminés par chromatographie d'exclusion avec des colonnes analytiques de types Sepharose-12 et Sepharose-6 préalablement calibrées.

Constructions de MKLP-1	Surexpression (mg/L)	Séquençage N-terminal	Masse théorique (Da)	Masse observée (Da)	Séquençage plasmide	Oligomère
MKLP-1 ₂₆₋₄₃₅	20	MVG VYCRV*	48124	48124	Correct	monomère
MKLP-1 ₁₋₄₄₉	15	MESARAKT*	52082	52082	Correct	monomère
MKLP-1 ₁₋₅₃₀	0.1	MESARAKT*	61567	61567	Correct	<i>n.d.</i>
MKLP-1 ₁₋₅₆₅	3	MESARAKT*	65663	65664	Correct	dimère
MKLP-1 ₁₋₆₂₁	2	MESARAKT*	72471	72472	Correct	dimère
MKLP-1 ₁₋₈₅₇	0.1	MESARAKT*	99169	protéolysé	Correct	<i>n.d.</i>
MKLP-1 ₆₂₂₋₈₅₇	0.7	MHHHHHHA MKVAKDLV*	27842	27842	Correct	dimère
MKLP-1 ₅₈₃₋₈₅₇	0.7	MHHHHHHA MKVAKDLV*	32744	32744	Correct	dimère
MKLP-1 ₅₃₂₋₈₅₇	0.7	MHHHHHHA MKVAKDLV*	38661	38661	Correct	dimère
MKLP-1 ₁₋₄₄₉ L6_KHC	15	MESARAKT	44722	44722	Correct	monomère
MKLP-1 ₂₆₋₄₃₅ L6_KHC	20	MVG VYCRV	40764	40764	Correct	monomère

n.d. : non déterminé.

(★) Détection d'autres séquences de MKLP-1 débutant aux acides aminés N° 161, 163, 166 et 172. Elles résultent d'une sensibilité de MKLP-1 à la protéolyse au niveau de sa boucle L6.

(*) Protéine co-purifiée correspondant à l'extrémité N-terminale de la FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomérase.

3.1.3. Expression des fragments de MgcRacGAP

La protéine MgcRacGAP est faiblement produite dans le système d'expression bactérien *E. coli* malgré le criblage de plusieurs souches d'expressions bactériennes (*E. coli* BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3) star et BL21 (DE3) codon plus) ou de vecteurs d'expressions (pET-M20, pET-M30 ou pET-28a). Ainsi, parmi les quatre constructions clonées, les protéines MgcRacGAP₁₋₁₀₇ et MgcRacGAP₃₆₀₋₆₃₁ se révèlent insolubles (**tableau 5**). Seules les constructions MgcRacGAP₁₁₀₋₆₃₂ et la protéine entière MgcRacGAP₁₋₆₃₂ ont abouti à l'expression d'une faible fraction soluble (une grande quantité restant dans la fraction insoluble).

MgcRacGAP₁₋₁₀₇ et MgcRacGAP₃₆₀₋₆₃₁ étant exprimées sous forme de corps d'inclusions, j'ai tenté de les re-solubiliser et de les replier *in-vitro* par trois méthodes de dénaturation/renaturation (Tsumoto et al., 2003). Ces trois protocoles de renaturation ont été mis en place après une première étape de solubilisation et de dénaturation des protéines exprimées sous forme de corps d'inclusions, avec 6 M urée. Des essais de renaturation ont ensuite été appliqués en utilisant un protocole de dilution rapide, ou d'élimination lente de l'urée par dialyse. Néanmoins, les constructions insolubles de MgcRacGAP précipitent lors de ces processus de renaturation. J'ai aussi essayé la renaturation sur colonne d'affinité, mais cela c'est révélé inefficace ; les deux protéines MgcRacGAP₁₋₁₀₇ et MgcRacGAP₃₅₀₋₃₆₂ précipitant lors des lavages visant à éliminer l'urée graduellement.

De plus, pour améliorer l'expression des fragments de MgcRacGAP, j'ai effectué une co-expression en système bactérien des protéines MgcRacGAP₁₋₆₃₂ ou MgcRacGAP₁₋₁₀₇ avec leur protéine partenaire MKLP-1₁₋₅₆₅. J'ai alors co-transformé la souche d'expressions *E. coli* BL21 DE3 star avec un vecteur pET-28 (résistance kanamycine) contenant la séquence codante de MKLP-1₁₋₅₆₅ et avec un vecteur pET-M20 (résistance ampicilline) contenant la séquence codante d'une des deux constructions de MgcRacGAP (Velappan et al., 2007). Cependant, la co-expression n'a pas permis d'accroître la solubilité de MgcRacGAP.

Tableau 5 : Analyse qualitative des constructions clonées et exprimées de MgcRacGAP dans les vecteurs pET-28a (étiquette poly-histidine C-terminale). Les séquençages N-terminaux de chaque protéine furent effectués par dégradation d’Edman (Applied Biosystem gas-phase sequencer model 492). La détermination des masses a été réalisée par spectrométrie de masse en mode electrospray (ESI) et les plasmides séquencés par l’entreprise *GenomeExpress*.

Constructions de MgcRacGAP	Surexpression (mg/L)	Séquençage N-terminal	Masse théorique (Da)	Masse observée (Da)	Séquençage plasmide	Vecteur
MgcRacGAP ₁₋₆₃₂	0.1	MDTMMLNV	71848	71848	correct	pET-28a
MgcRacGAP ₁₁₀₋₆₃₂	0.1	MGDTSGSI	58846	58846	correct	pET-28a
MgcRacGAP ₃₆₃₋₅₃₇	Insoluble	n.d.	20744	n.d.	correct	pET-28a pET-M20 pET-M30
MgcRacGAP ₁₋₁₀₇	Insoluble	n.d.	13926	n.d.	correct	pET-28a pET-M20 pET-M30

3.1.4. Historique des essais de cristallogénèse

La cristallographie aux rayons X est devenue la méthode la plus utilisée pour la détermination de la structure atomique des macromolécules biologiques. Pour ce faire, plusieurs étapes sont nécessaires. La première nécessite l’obtention de protéines pures, homogènes et en grandes quantités, afin de cribler de nombreuses conditions précipitantes permettant d’aboutir à la formation d’un cristal. Les cristaux de protéines ainsi obtenus doivent être de bonne qualité et diffracter les rayons X à une résolution suffisante pour déterminer la structure des molécules ordonnées qui le compose.

Un effort constant fut apporté pour tenter d’élucider l’organisation structurale de MKLP-1 et de sa protéine partenaire MgcRacGAP par cristallographie. Afin de satisfaire ce projet, j’ai entrepris le clonage des constructions protéiques en abordant une stratégie d’essais – erreur. Au cours de ma thèse, je suis retourné quatre fois à l’étape de clonage afin de rationaliser le

design des fragments protéiques en vue d'essais de cristallogénèse. En effet, le choix et l'opportunité de tronquer une partie de la macromolécule est souvent essentiel à l'obtention de protéines en grandes quantités, stables, homogènes et plus favorables à la cristallisation. Il est relevant qu'une grande flexibilité au sein d'une protéine limite les chances de succès quant à l'élaboration d'une organisation cristalline. Il est ainsi souvent judicieux d'entreprendre le travail cristallographique en abordant l'étude des domaines séparément et/ou tronqués de leurs extrémités trop labiles. Ainsi, la succession des retours au clonage en raison de l'échec des essais de cristallisation, répond à une volonté d'optimiser empiriquement le potentiel de réussite. Dans le cadre de ce projet, j'ai ainsi criblé *via* les plateformes de robots de cristallisation 9 constructions protéiques de MKLP-1 (MKLP-1₂₆₋₄₃₅ ; MKLP-1₁₋₄₄₉ ; MKLP-1₁₋₅₆₅ ; MKLP-1₁₋₆₂₁ ; MKLP-1_{26-435_L6_KHC} ; MKLP-1_{1-449_L6_KHC} ; MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇ ; MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ ; MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇) et deux de MgcRacGAP (MgcRacGAP₁₋₆₃₂ ; MgcRacGAP₁₁₀₋₆₃₂). Pour chaque fragment, j'ai testé 768 conditions de précipitant commerciales, à différentes conditions de température (4 et 20°C) et pour une gamme de concentration en protéines de 3 à 40 mg/ml selon les constructions protéiques criblées. Une gamme supplémentaire de 96 conditions de précipitants a aussi été conçue en regroupant les formules de cristallisation de l'ensemble des kinésines déjà cristallisées avec succès. Cette gamme spécialement pensée pour les kinésines a été utilisée pour le criblage des quatre constructions du domaine moteur (sauvages et mutants de la boucle L6). De plus, plusieurs essais manuels de cristallisation ont été réalisés autour de certaines conditions jugées intéressantes suite aux criblages automatisés.

3.1.5. Résultat des expériences de cristallogénèse

Ci-dessous est résumé l'enchaînement des étapes successives de clonage et les stratégies appliquées :

1 – Mes premières tentatives de cristallogénèse furent réalisées avec les deux constructions MKLP-1₁₋₄₄₉ et MKLP-1₁₋₆₂₁, correspondant respectivement au domaine moteur seul ou avec la région d'enroulement en super-hélice. La construction sauvage MKLP-1₁₋₈₅₇, étant totalement protéolysée en deux fragments, je n'ai pu tenter de la cristalliser. La méthode de cristallogénèse employée est la diffusion de vapeur par goutte assise. Aucun cristal n'a été obtenu.

2 – N’obtenant aucun cristal avec les trois précédentes constructions, j’ai procédé au clonage du fragment MKLP-1₂₆₋₄₃₅. Cette construction fut établie suite aux recherches de similitude avec les séquences de constructions protéiques des domaines moteurs ayant déjà été cristallisés. Ces alignements m’ont permis de restreindre les bornes minimales du domaine moteur de MKLP-1 entre les acides aminés 26 et 435 (**figure 23**). Cette nouvelle construction exclue l’extrémité N-terminale connue pour son activité régulatrice de la fonction motrice (Mishima et al., 2004) et tronque la région intermédiaire « cou » liant le domaine moteur à la super-hélice. L’intérêt de cette démarche guidée par la forte homologie de séquence et de structure des domaines moteurs de kinésines, fut d’obtenir par analogie un fragment cristallisable sur le modèle des constructions de domaines moteurs référencés dans la Protein Data Bank (PDB).

3 – L’échec des essais de cristallogénèse de MKLP-1 laisse penser que la protéine aurait peut-être besoin d’un partenaire pour sa stabilisation. J’ai donc entrepris l’expression de sa protéine partenaire (MgcRacGAP) dans l’optique de tenter sa cristallisation, seule ou en complexe avec MKLP-1. En effet, la cristallisation de complexes est parfois privilégiée en raison de l’instabilité des protéines dans un contexte isolé. À cette fin, j’ai effectué le clonage de différents domaines de MgcRacGAP (MgcRacGAP₁₋₁₀₇, MgcRacGAP₁₋₆₃₂, MgcRacGAP₁₁₀₋₆₃₂, MgcRacGAP₃₆₃₋₅₃₇). Parallèlement, j’ai sous-cloné une construction de MKLP-1 incluant le domaine moteur et la région d’interaction à MgcRacGAP qui lui est contiguë (MKLP-1₁₋₅₆₅). Malheureusement, seul deux constructions de MgcRacGAP furent solubles en faibles proportions. Aucun cristal des deux fragments soluble de MgcRacGAP ne fut obtenu et la construction dimérique MKLP-1₁₋₅₆₅ n’a pas cristallisé.

4 – Malgré toutes les précautions prises, MKLP-1 se révèle extrêmement sensible à la protéolyse. Un site sensible aux protéases sera identifié par séquençage peptidique N-terminal par spectrométrie de masse en tandem avec la collaboration du Dr Bernd Thiede de l’Université d’Oslo. La boucle L6, particulièrement longue chez les kinésines représentantes de la sous-famille 6 (MKLP-1, MKLP-2, MPP1) est ici clivée au niveau des acides aminés 161, 163, 166 et 172 par les endoprotéases bactériennes. Cette forte sensibilité aux protéases est à l’origine d’une population hétérogène (protéine clivée $\approx 5\%$), et indique une accessibilité élevée de la boucle L6 au solvant. De plus, cette sensibilité protéolytique, laisse envisager que cette boucle est peu structurée ou très flexible. Pour obtenir une protéine plus

stable et résistante aux dégradations, j'ai alors élaboré un mutant remplaçant la boucle L6 de MKLP-1 par la boucle équivalente de Kif5B (boucle L6 de MKLP-1 : 80 acides aminés ; boucle L6 de KIF5B : 5 acides aminés). Cette mutation réalisée sur les deux clones du domaine moteur MKLP-1₁₋₄₄₉ et MKLP-1₂₆₋₄₃₅ accroît la stabilité de la protéine en lui faisant acquérir une résistance à la protéolyse (**figure 25**). Cependant, aucun cristal ne fut obtenu avec les deux mutants MKLP-1_{1-449_L6_KHC} et MKLP-1_{26-435_L6_KHC}.

5 – Simultanément à l'élaboration des deux mutants de la boucle L6, un effort particulier fut aussi apporté sur l'extrémité C-terminale d'interaction au cargo ; un domaine pour lequel nous ne disposons que de faibles informations structurales. Trois clonages m'ont permis d'exprimer les constructions MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₋₈₅₇ et MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇ correspondant respectivement au domaine d'interaction au cargo seul ou en présence d'une prolongation plus ou moins longue du domaine en super-hélice. Aucun cristal ne fut obtenu à partir de ces trois fragments.

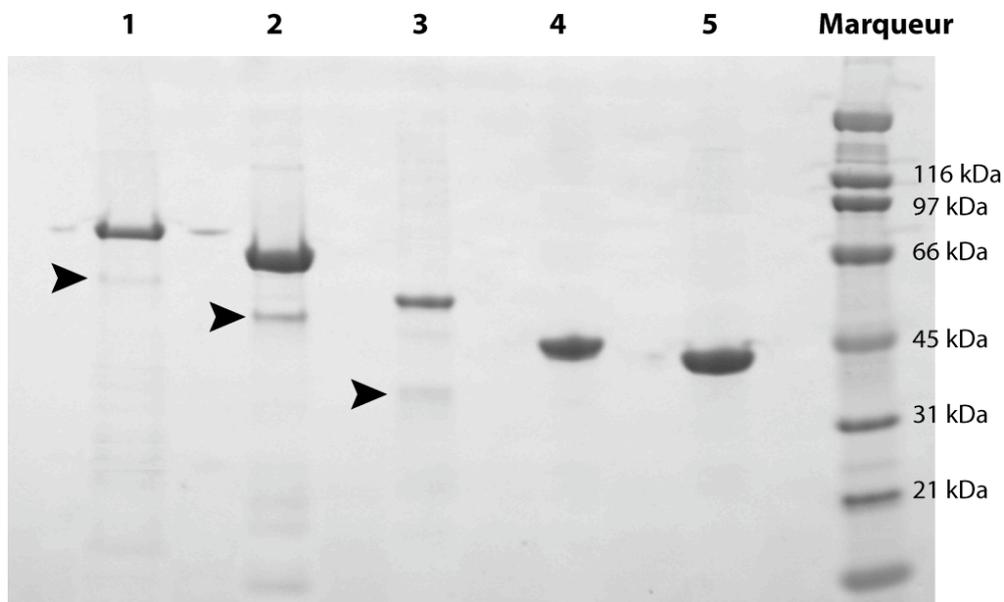


Figure 25 : Gel SDS-PAGE de différentes constructions protéiques de MKLP-1. (1) MKLP-1₁₋₆₂₁ (2) MKLP-1₁₋₅₆₅ (3) MKLP-1₁₋₄₄₉ (4) MKLP-1_{1-449_L6_KHC} et (5) MKLP-1_{26-435_L6_KHC}. Les flèches indiquent les bandes de dégradations résultant d'une protéolyse au sein des résidus 161, 163, 166 et 172 localisé dans la boucle L6. Les deux mutant de cette boucle (MKLP-1_{1-449_L6_KHC} et MKLP-1_{26-435_L6_KHC}) ne subissent pas de protéolyse.

3.2. Caractérisation de la boucle L6 de MKLP-1

Ils existent plusieurs types de kinésines réparties en plusieurs sous familles, assumant chacune différents rôles cellulaires dont certains restent encore à définir. MKLP-1 est la kinésine représentante de la sous-famille 6, dont la singularité majeure provient d'un large insert avoisinant les 80 acides aminés dans la boucle L6 du domaine moteur (**figure 26**). Comparativement, les autres kinésines possèdent des boucles L6 relativement courtes de seulement quelques acides aminés. Actuellement, aucune structure atomique de kinésine de cette sous-famille n'a pu être obtenue, et l'implication fonctionnelle de la boucle L6 n'a jamais été attribuée. Disposant de la protéine MKLP-1₁₋₄₄₉ sauvage et la protéine MKLP-1_{1-449_L6_KHC} mutée dans la boucle L6, j'ai entrepris la caractérisation de ces deux domaines moteurs dont l'un arbore la boucle L6 de la kinésine conventionnelle Kif5B. J'ai ainsi recherché leurs différences quant à l'activité enzymatique et leur affinité vis-à-vis des microtubules. Cette caractérisation a pour but d'apprécier une possible participation de la boucle L6 de MKLP-1 dans le cycle catalytique de l'enzyme, ou dans la reconnaissance avec les microtubules. La mesure des activités cinétiques permet alors de caractériser outre les vitesses de réactions des enzymes, leurs constantes d'affinités pour le substrat ou les microtubules.

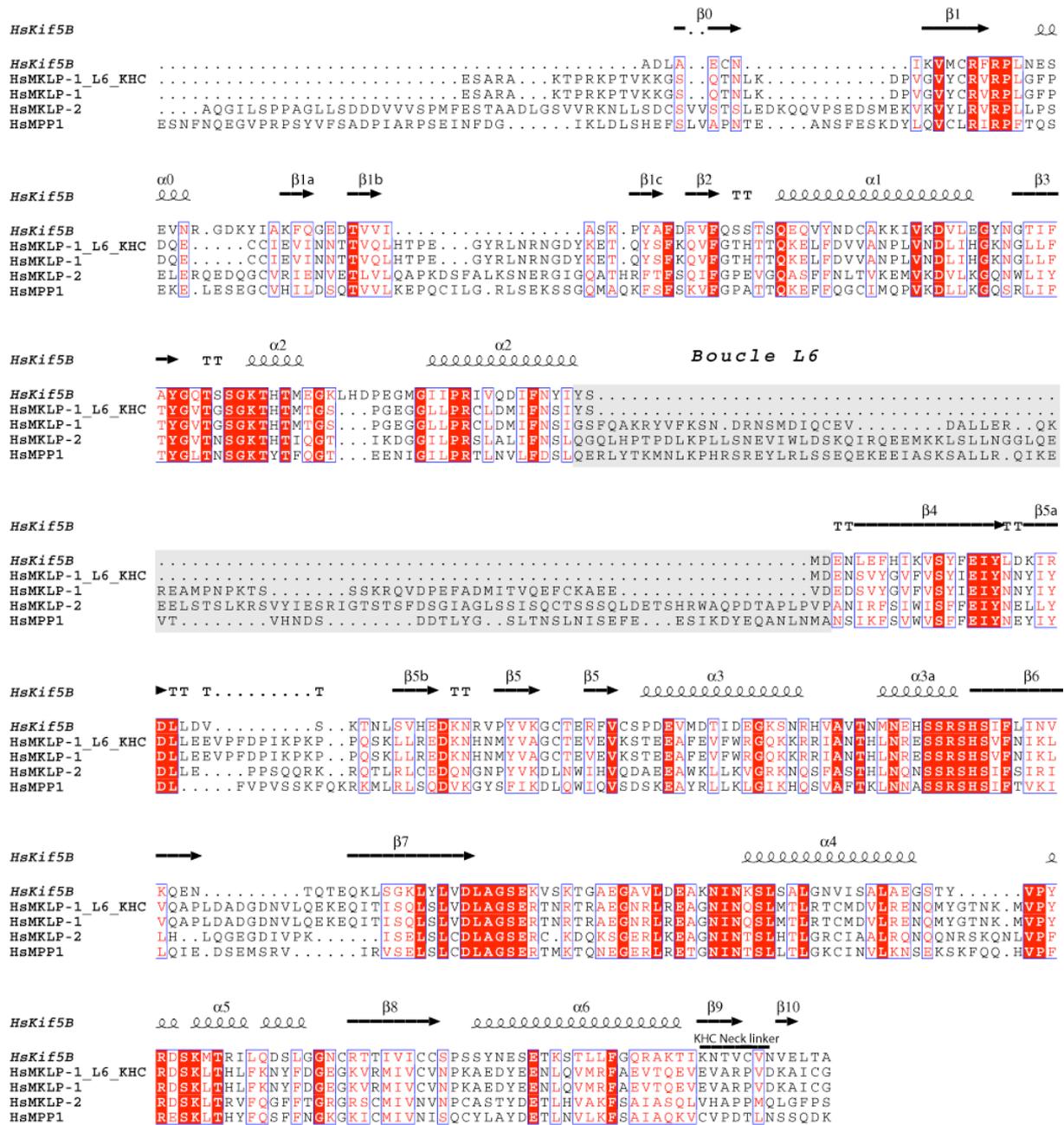


Figure 26 : Alignement de séquences humaines des domaines moteurs de trois kinésines de la sous-famille 6 (MKLP-1, MKLP-2 et MPP1), de la construction mutante MKLP-1_{1-449_L6_KHC} et de KIF5B. Les éléments de structure secondaire indiqués en tête, correspondent au repliement de KIF5B. Les acides aminés identiques sont sur fond rouge et les résidus de même caractéristiques sont en rouges. Les boucles L6 sont désignées par un fond gris. L'alignement est généré en utilisant ClustalW (Thompson et al., 1994) et visualisé avec le programme ESPript (Gouet et al., 1999).

3.2.1. Activité Basale

Les kinésines peuvent être régulées de multiples façons selon les cas, mais elles possèdent toutes une faculté commune de stimulation en présence de microtubules. On mesurera ainsi une activité dite « basale » en absence de microtubule et « stimulée » en présence des polymères de tubuline. La dépendance du cytosquelette sur l'activité catalytique obéit à une logique d'économie d'énergie en limitant la consommation inutile d'ATP. Ainsi, les kinésines seront uniquement à leur plein effort catalytique lors de leur marche le long des microtubules, puis en activité ralentie en dehors de ce système.

L'une des premières caractérisations fut de sonder l'effet du sel sur l'activité des deux constructions MKLP-1₁₋₄₄₉ et MKLP-1_{1-449_L6_KHC} (**figure 27**). L'activité de l'enzyme se révèle optimale à faible concentration saline comme le suggère la figure 27. L'activité du mutant (MKLP-1_{1-449_L6_KHC}) est sensiblement proche de la construction sauvage (MKLP-1₁₋₄₄₉) dans les conditions optimales (50 mM NaCl). Néanmoins, le mutant est visiblement plus sensible au sel, en raison d'une décroissance plus rapide de sa vitesse catalytique.

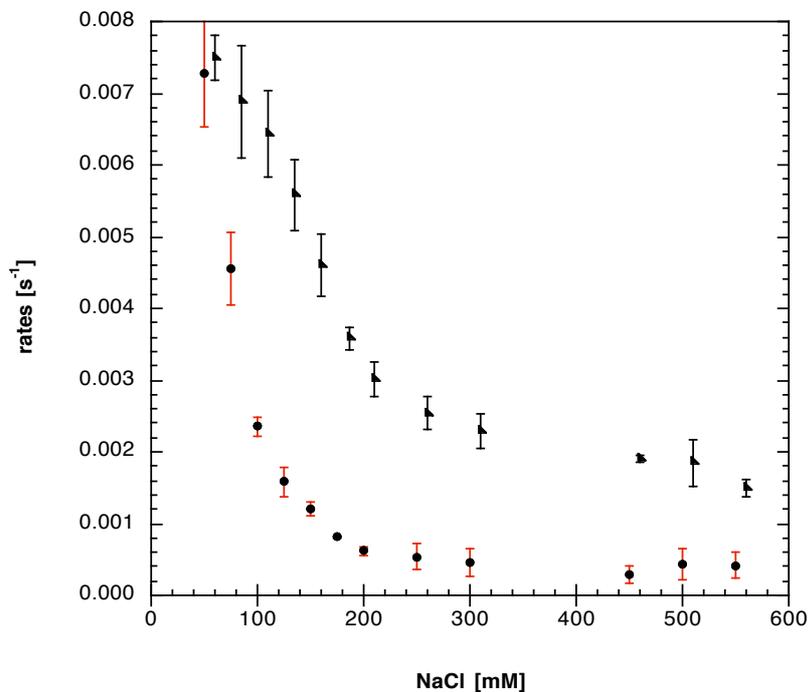


Figure 27 : Effet du sel sur l'activité catalytique basale des domaines moteurs MKLP-1₁₋₄₄₉ (▲) et MKLP-1_{1-449_L6_KHC} (●), en condition saturante en substrat (1mM ATP). Les vitesses sont exprimées en nombre d'ATP hydrolysés par enzyme et par seconde (s⁻¹).

Reproduites sur la figure 28, les activités cinétiques basales du domaine moteur mutant et sauvage sont représentées en fonction de la concentration d'ATP. L'estimation de la constante catalytique (k_{cat}) et d'affinité ($K_{m(ATP)}$) sont déterminées à partir de ce graphe et résumées dans le tableau 6 en utilisant l'équation 2 (page 60) comme fonction de régression pour l'obtention de ces paramètres. La protéine MKLP-1 est une enzyme de type Michaelienne dont les points sont parfaitement corrélés et modélisés par l'hyperbole quadrilatère de l'équation 2.

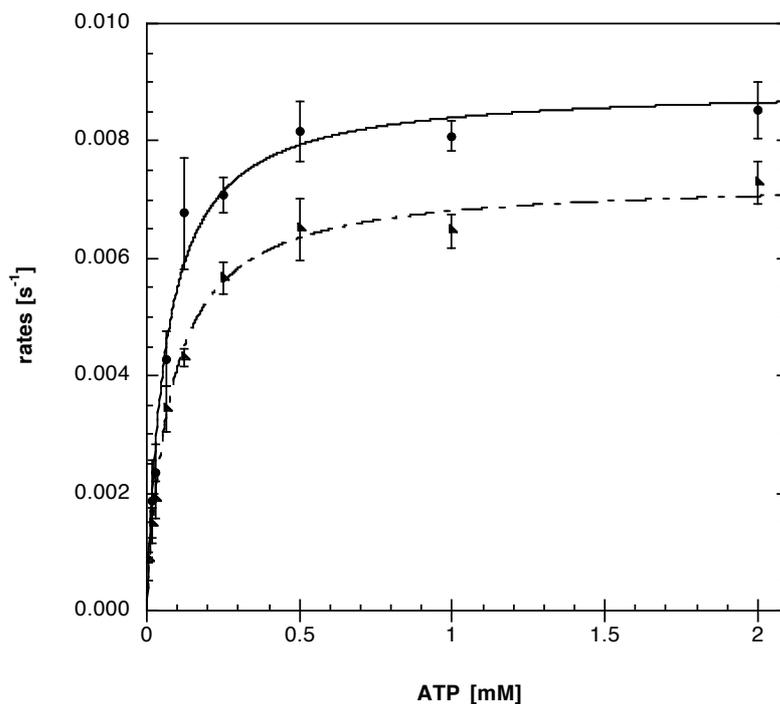


Figure 28 : Évolution de l'activité cinétique de la fonction ATPasique des deux domaines moteurs MKLP-1₁₋₄₄₉ (▲) et MKLP-1_{1-449_L6_KHC} (●), caractérisés à basse concentration saline (50 mM NaCl). La mesure des valeurs des constantes k_{cat} et $K_{m(ATP)}$ sont résumés dans le tableau 6.

Conformément à la sensibilité au sel de MKLP-1 (**figure 27**) la mesure des constantes cinétiques à l'état basal ont été réalisées à faible concentration saline (50 mM NaCl). Il se dégage de la détermination des k_{cat} et $K_{m(ATP)}$ de MKLP-1₁₋₄₄₉ et MKLP-1_{1-449_L6_KHC} une parité de leur $K_{m(ATP)}$ voisin, respectivement de 77 et 62 μ M envers leur substrat (ATP). Les vitesses maximales basales sont elles aussi du même ordre de grandeur avec 0.009 s^{-1} pour le fragment

sauvage et 0.007 s^{-1} pour le mutant de la boucle L6. Si une légère différence demeure au niveau des activités maximales des deux constructions, elle ne représente qu'une sensibilité plus forte pour la protéine mutante vis-à-vis de la condition saline (**figure 27**). Il est à noter que ces vitesses réactionnelles maximales sont faibles avec des cycles catalytiques de l'ordre de 2 à 3 minutes pour l'hydrolyse d'un ATP par enzyme. À titre de comparaison, Kif5B possède à l'état basal un k_{cat} de 0.5 s^{-1} et 0.11 s^{-1} pour la kinésine mitotique CENP-E, tandis que MKLP-2 une autre kinésine de la sous-famille 6 possède tout comme MKLP-1 une vitesse maximale basale faible de 0.034 s^{-1} .

Tableau 6 : Tableau récapitulatif des paramètres cinétiques du domaine moteur sauvage MKLP-1₁₋₄₄₉ et mutant MKLP-1_{1-449_L6_KHC} à l'état stimulé et basal. Les paramètres référencés correspondent aux vitesses maximales (k_{cat}), à l'affinité pour l'ATP ($K_{\text{m, ATP}}$) et pour les microtubules ($K_{0.5, \text{MT}}$).

Construction de MKLP-1	Activité ATPasique basale		Activité ATPasique stimulée		
	k_{cat} (s^{-1})	$K_{\text{m, ATP}}$ (μM)	k_{cat} (s^{-1})	$K_{0.5, \text{MT}}$ (μM)	$K_{\text{m, ATP}}$ (nM)
MKLP-1 ₁₋₄₄₉	0.009	62	1.37	294	163
MKLP-1 _{1-449_L6_KHC}	0.007	77	1.49	39	199

3.2.2. Activité stimulée

À l'instar de l'activité basale, l'influence de la mutation de la boucle L6 de MKLP-1 a aussi été éprouvée face à la reconnaissance de l'ATP en conditions stimulées par les microtubules (**figure 29**). Ainsi à l'état stimulé, les constantes de $K_{\text{m(ATP)}}$ et de k_{cat} du domaine moteur sauvage et mutant sont déterminés à partir des cinétiques de la figure 29 ci-dessous, et résumés dans le tableau 6 ci-dessus. De façon similaire aux conditions basales (sans microtubules), les vitesses maximales de catalyses sont là aussi voisines entre ces deux constructions, avec un k_{cat} de 1.37 s^{-1} pour MKLP-1_{1-449_L6_KHC} et 1.49 s^{-1} pour MKLP-1₁₋₄₄₉. Tout comme MKLP-2 (1.8 s^{-1}) kinésine de la même sous famille, la vitesse maximale stimulée de MKLP-1 est parmi les plus lentes. À titre d'exemple, la kinésine la plus rapide (Kif5B) possède en présence de microtubule un k_{cat} de 90 s^{-1} alors que CENP-E arbore une

vitesse maximale de 8 s^{-1} . Les paramètres d'affinités de l'enzyme pour l'ATP ($K_{m(\text{ATP})}$), sont eux aussi sensiblement proches pour les deux constructions, avec $199 \mu\text{M}$ pour MKLP-1_{1-449_L6_KHC} et $163 \mu\text{M}$ pour MKLP-1₁₋₄₄₉. À la connaissance de ces résultats, la mutation de la boucle L6 par celle de KIF5B ne semble avoir aucune incidence sur l'activité catalytique, ni sur l'affinité de l'enzyme envers l'ATP.

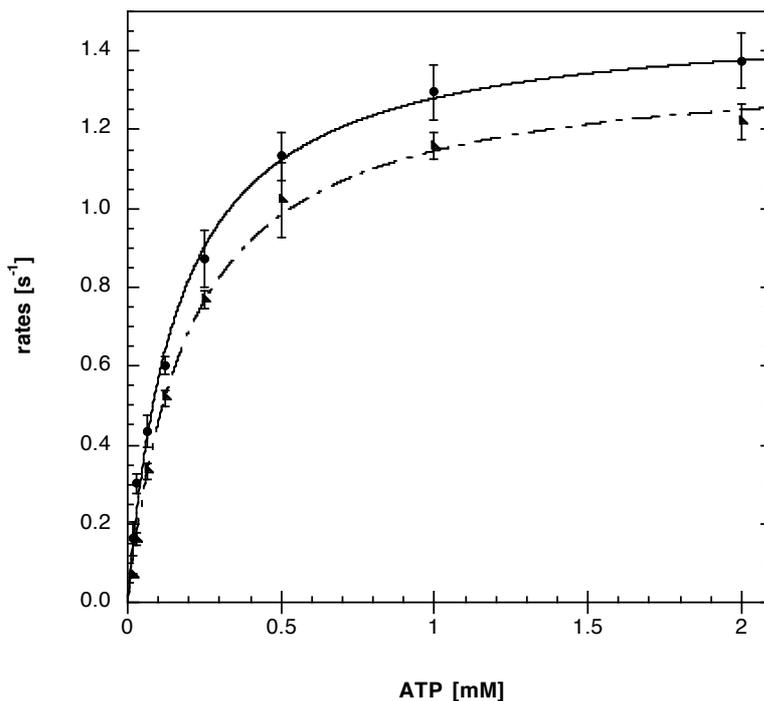


Figure 29 : Evolution de l'activité ATPasique des domaines moteurs MKLP-1₁₋₄₄₉ (\blacktriangle) et MKLP-1_{1-449_L6_KHC} (\bullet), en fonction de la concentration en ATP (en présence de $2 \mu\text{M}$ de tubuline polymérisée et 20 mM NaCl). La détermination des valeurs des constantes k_{cat} et $K_{0.5, \text{MT}}$ sont résumés dans le tableau 6.

Comme les autres kinésines, la cinétique ATPasique de MKLP-1 est stimulée en présence de microtubules. La figure 30 illustre pour les domaines moteurs MKLP-1₁₋₄₄₉ et MKLP-1_{1-449_L6_KHC} l'évolution de cette stimulation en fonction de la concentration en microtubules. Les constantes d'affinité de l'enzyme pour les microtubules ($K_{0.5, \text{MT}}$) extraite de la figure 30 sont résumées dans le tableau 6. Les vitesses maximales (k_{cat}) observées sont respectivement de 1.1 s^{-1} et 1.2 s^{-1} pour MKLP-1₁₋₄₄₉ et MKLP-1_{1-449_L6_KHC}. Ces mesures sont redondantes avec les k_{cat} déjà mesurés avec les cinétiques de la figure 29 dans des conditions similaires ($k_{\text{cat}} \approx 1.4 \text{ s}^{-1}$).

¹). On observe pour ces deux constructions une activité stimulée 150 fois par rapport à leurs activités basales. Remarquons que si la mutation n'a aucune incidence sur l'activité maximale stimulée où les k_{cat} sont sensiblement équivalents entre mutant et sauvage. Il persiste néanmoins une différence majeure quant à leur affinité envers les microtubules (**figure 30**). Le mutant MKLP-1_{1-449_L6_KHC} avec un $K_{0.5,MT}$ de 39 nM est huit fois plus affiné au microtubule que le domaine sauvage MKLP-1₁₋₄₄₉ ayant un $K_{0.5,MT}$ de 294 nM. La mutation de la boucle L6 introduite dans la construction MKLP-1_{1-449_L6_KHC} ne modifie alors aucunement le potentiel catalytique du domaine moteur, mais influe sur la capacité de reconnaissance des microtubules.

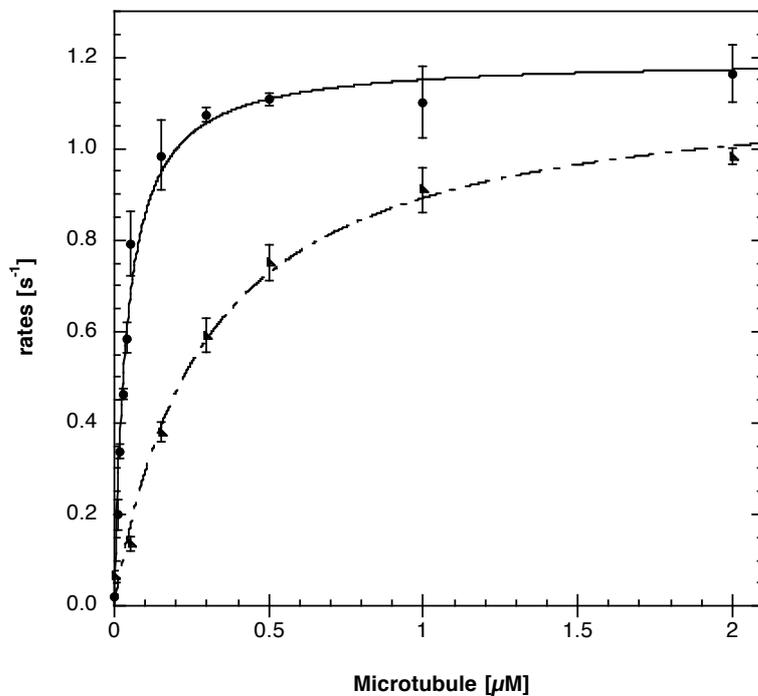


Figure 30 : Stimulation de l'activité ATPasique des domaines moteurs MKLP-1₁₋₄₄₉ (▲) et MKLP-1_{1-449_L6_KHC} (●), en fonction de la concentration de microtubules (1 mM ATP, 20 mM NaCl). Les valeurs des constantes $K_{0.5,MT}$ sont résumées dans le tableau 6.

3.3. Criblage

3.3.1. Intérêt

Certaines kinésines, dont MKLP-1, sont nommées kinésines mitotiques en raison de leurs participations dans la ségrégation des chromosomes, l'élaboration du fuseau mitotique ou la séparation des cellules filles. MKLP-1 joue un rôle primordial lors de la division cellulaire en raison de sa participation à la mise en place d'éléments essentiels au bon déroulement de la cytokinèse. En effet, des expériences d'interférences ARN (Matulienė et Kuriyama, 2002) et de micro-injections d'anticorps neutralisant MKLP-1 (Nislow et al., 1990), révèlent que l'absence ou l'inhibition de MKLP-1 induit un arrêt mitotique des cellules CHO. Ces données font donc de MKLP-1 une cible potentielle aux drogues à visées antimitotiques. Ces kinésines mitotiques sont des cibles d'intérêts médicales importantes de par leurs implications étroites et spécifique au bon déroulement de la division cellulaire (Miyamoto et al., 2003 ; Wood et al., 2001). Aujourd'hui, une des voies principalement utilisée contre le cancer est l'emploi de molécules de types *vinca-alcaloïdes* et *taxanes*, agissant sur la stabilité des microtubules (Arnal et Wade, 1995). Néanmoins, ces agents anticancéreux présentent des effets indésirables importants (neurotoxique, neutropénie...) car ils interfèrent avec de nombreuses activités cellulaires dépendant de la dynamique des microtubules. L'intérêt de rechercher des inhibiteurs spécifiques de kinésines mitotiques est de découvrir des molécules potentiellement anticancéreuses, basées sur un mode d'action alternatif aux drogues ciblant les microtubules. L'utilisation de ce genre d'inhibiteur serait par conséquent moins toxique car ciblant uniquement une enzyme clef de la mitose.

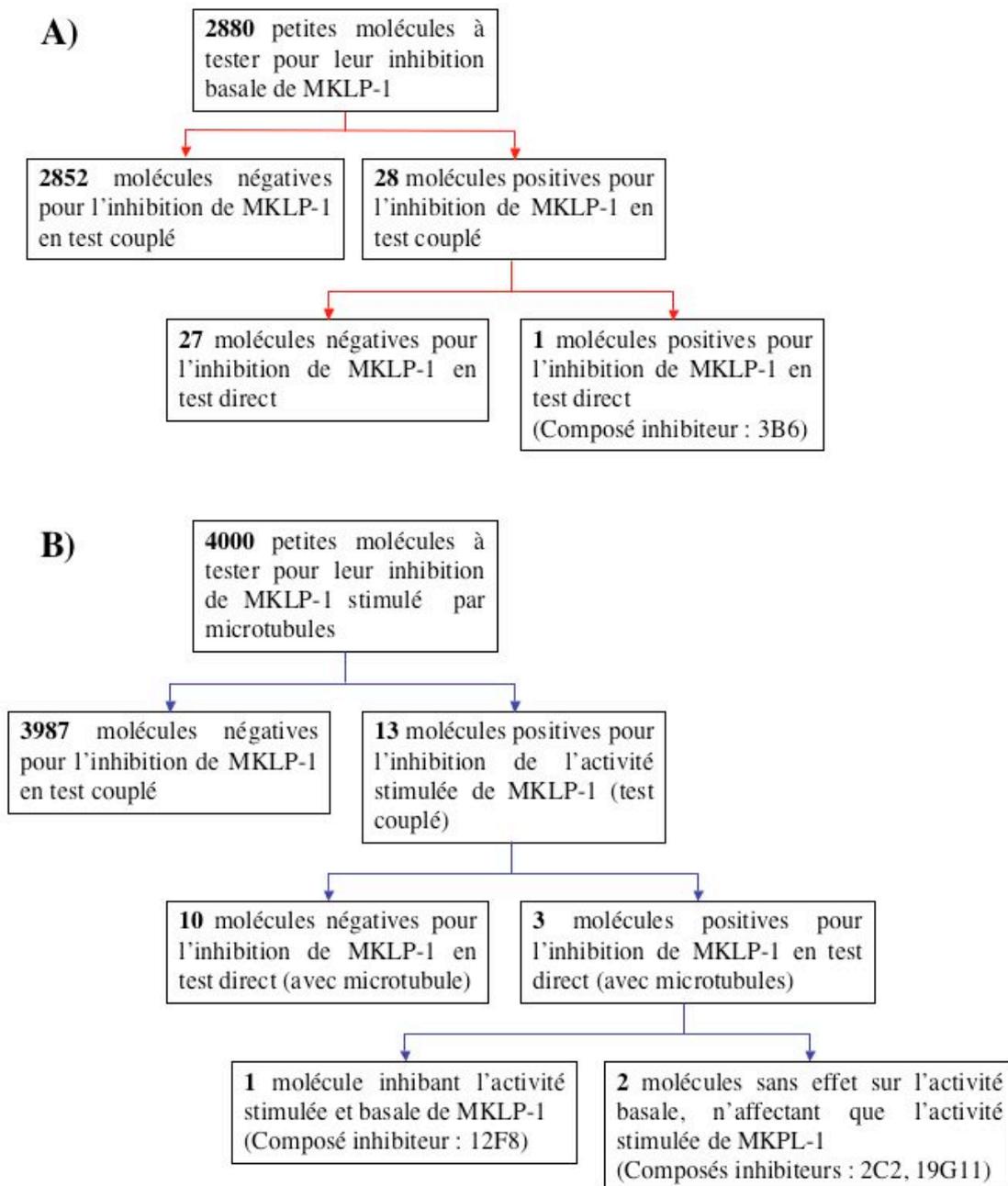


Figure 31 : Résumé de la procédure employée pour le criblage *in vitro* de 6880 molécules. **(A)** Une partie des chimiothèques (2880 molécules) a d'abord été criblée sur l'activité basale de MKLP-1. **(B)** En raison de la faible célérité de l'activité basale de MKLP-1, les 4000 autres composés ont été criblés sur leur capacité d'inhibition de l'activité stimulée de MKLP-1 (en présence de 2 μ M de tubuline). L'effet des composés est d'abord observé avec un test enzymatique couplé avec la lactate déshydrogénase et la pyruvate kinase, puis confirmé lors d'un second criblage utilisant un test direct par mesure du phosphate inorganique libéré lors de l'hydrolyse de l'ATP par MKLP-1. (3B6, 12F8, 2C2 et 19G11 sont les noms des quatre inhibiteurs confirmés lors de ces criblages).

3.3.2. Identification d'inhibiteurs potentiels

La découverte d'inhibiteurs potentiels de l'activité ATPasique de MKLP-1 nécessite l'obtention d'une construction active, stable, et exprimée en grande quantité. Ainsi, les criblages *in vitro* ont été réalisés avec le fragment MKLP-1₁₋₄₄₉ justifiant à ces critères d'exigences, et pour laquelle les paramètres cinétiques ont été préalablement caractérisés (**tableau 4**). Le criblage fondé sur la modulation de l'activité ATPasique du domaine moteur de MKLP-1 a rassemblé un total de 6880 molécules issues de quatre chimiothèques. Ces bibliothèques de molécules testées dans le cadre de ce projet, nous ont été fournies par l'Institut de Chimie et des substances naturelles (ICSN), l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) et par le National Cancer Institute (NCI/NIH). L'ensemble de ces chimiothèques constitue un catalogue de molécules purifiées à partir d'extraits de plantes originaires de la canopée Vietnamiennne, de molécules de synthèse ou d'un ensemble de molécules présélectionnées sur leurs capacités à inhiber la prolifération de lignées cellulaires cancéreuses. Les différents composés de ces chimiothèques, solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), ont été criblés pour une concentration finale de 50 μM en présence de 3 μM de MKLP-1 (pour les mesures de l'activité basale), ou de 40 nM de MKLP-1 et 2 μM de tubulines polymérisées avec taxol (pour les mesures de l'activité stimulée).

La stratégie de criblage employée (**figure 31**), permet la lecture simultanée de 96 réactions enzymatiques dans un spectrophotomètre 96 puits Sunrise (TECAN), chacune réalisée dans un volume final de 100 μl (**figure 32**). Les différentes étapes expérimentales du protocole de criblage sont présentées à la figure 31. J'ai d'abord effectué un premier criblage sur l'activité basale de MKLP-1 avec 2880 molécules (**figure 31-A**). Le principe du criblage repose sur un test ATPasique indirect couplé à la lactate déshydrogénase et la pyruvate kinase (**figure 20**). Ce criblage a permis la sélection d'un premier groupe constitué de 41 candidats inhibiteurs (28+13). Sont considérées comme inhibitrices, les molécules pour lesquelles l'activité ATPasique mesurée sera inférieure à trois fois l'écart type de la moyenne des témoins négatifs (Zhang et al., 1999). Ce pool restreint de 41 inhibiteurs est ensuite contrôlé via un test direct mesurant le phosphate inorganique libéré par MKLP-1 lors de l'hydrolyse de l'ATP. Le premier criblage étant dépendant d'un ensemble d'enzyme, cette seconde mesure permet de sélectionner uniquement les inhibiteurs ciblant la protéine d'intérêt. Ce contrôle permet alors d'écarter les molécules interférant avec les composés enzymatiques du test indirect. Afin

d'appliquer une méthodologie haut débit, une stratégie de criblage reposant uniquement sur la mesure de l'inhibition par quantification directe du P_i libéré n'est pas envisageable en raison de la lourdeur expérimentale de ce type de mesure cinétique, et de son coût élevé. La détection d'un premier pool présélectionné par test enzymatique couplé (PK, LDH) permet un gain de temps associé à la fiabilité de cette méthode et de son application routinière. Sur les 41 composés sélectionnés après les tests enzymatiques couplés, seules 4 molécules (composés 3B6, 2C2, 12F8 et 19G11) ont été validées comme inhibiteurs de MKLP-1 par mesures directes des quantités de P_i libérés (**figure 31**).

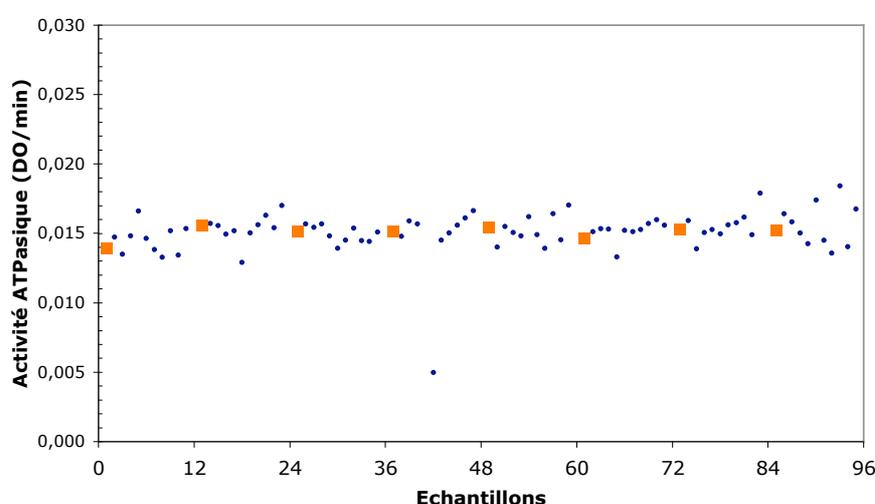


Figure 32 : Exemple d'un criblage *in vitro* basé sur l'activité ATPasique stimulée de MKLP-1. Lors du criblage, les composés sont testés simultanément par groupe de 80 dans des plaques de lecture de 96 puits. En orange sont indiquées les activités de huit témoins internes en présence de DMSO (solvant utilisé pour solubiliser les composés des bibliothèques chimiques). Les 80 points bleus correspondent chacun à l'activité de MKLP-1 en présence de 50 μM d'une des molécules de la chimiothèque. Seront considérés molécules inhibitrices, les composés pour lesquels l'activité catalytique est inférieure de trois fois l'écart type par rapport à la moyenne des témoins avec DMSO. L'expérience est réalisée en présence de 2 μM de tubuline polymérisée et 40 nM de MKLP-1₁₋₄₄₉.

Comme indiquées dans les étapes de criblage présentées à la figure 31, une partie des criblages reposent sur l'inhibition de l'activité catalytique basale de MKLP-1. Mais, en raison

de la faible activité ATPasique basale de ce domaine moteur, les criblages exécutés ultérieurement furent réalisés à l'état stimulé, en présence de 2 μM de tubulines polymérisées et de 40 nM d'enzyme (MKLP-1₁₋₄₄₉). La stimulation de l'activité catalytique induite par les microtubules (150 fois pour la construction MKLP-1₁₋₄₄₉) diminue alors le temps d'expérience des cinétiques de une heure (état basal), à seulement une dizaine de minutes (état stimulé). Cependant, dans le cadre du criblage basé sur l'activité stimulée de MKLP-1, les candidats inhibiteurs confirmés après mesures directes du P_i libéré, nécessitent un contrôle supplémentaire cherchant de possibles interférences des composés avec la dynamique des microtubules. En effet, une molécule affectant la polymérisation ou la dépolymérisation de la tubuline, induirait une inhibition apparente mais non réelle de l'activité de MKLP1. Ainsi, l'effet potentiel des trois inhibiteurs détectés en présence de microtubules fut caractérisé vis-à-vis de la polymérisation de la tubuline (**figure 33**). La polymérisation de la tubuline en microtubule étant à l'origine d'une élévation de la turbidité, ce phénomène est alors mesurable par spectrophotométrie en observant l'augmentation de densité optique. L'élongation nette des microtubules en présence des trois inhibiteurs 2C2, 19G11 et 12F8, est alors comparée aux témoins réalisés avec un inhibiteur de la polymérisation (nocodazole) ou un inhibiteur de la dépolymérisation (taxol). Il résulte de cette caractérisation que ces trois candidats inhibiteurs sont sans influence sur la dynamique du microtubule ; ils sont alors confirmés comme inhibiteurs de l'activité catalytique stimulée de MKLP-1. En effet, les polymérisations de tubuline en présence des molécules 2C2, 19G11 et 12F8 se comportent comme le témoin avec DMSO, signalant alors leur innocuité sur la dynamique des microtubules. Contrairement, en présence de nocodazole on assiste à une perte de la capacité de polymérisation tandis que la cinétique de polymérisation nette en présence de taxol est considérablement accrue.

Il est important de noter que confronter les chimiothèques face à l'activité stimulée de la kinésine, offre l'avantage de pouvoir déceler des composés ciblant la formation du complexe kinésine / microtubule. Car les inhibiteurs bloquant la stimulation du domaine moteur ne sont pas accessibles lors d'un criblage basé sur l'activité basale.

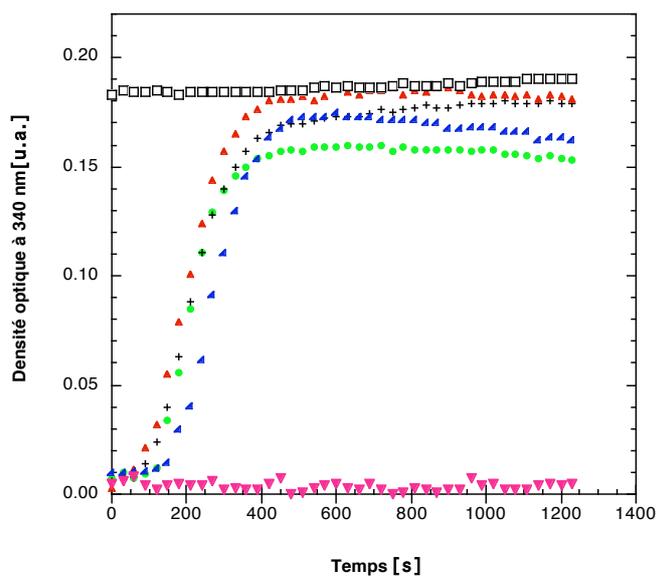


Figure 33 : Suivi de la polymérisation nette de la tubuline au cours du temps. Les polymérisations sont observées en présence de DMSO (●), des trois molécules inhibitrices 2C2 (▲), 19G11 (+), 12F8 (▲), de nocodazole (▼), ou de taxol (◻). Les trois composés 2C2, 19G11 et 12F8 ne perturbent pas la dynamique des microtubules.

3.3.3. Détermination des IC_{50}

Pour comparer l'efficacité des quatre composés inhibant MKLP-1 (12F8, 3B6, 19G11, 2C2), j'ai déterminé les valeurs d' IC_{50} de chacune de ces molécules. Pour cela, j'ai estimé le pourcentage d'inhibition de MKLP-1 en fonction de la concentration en inhibiteur (**Figure 34**). L' IC_{50} correspond alors à la dose d'inhibiteur à laquelle coïncide une inhibition de 50% de l'activité maximale. Plus l' IC_{50} est faible et plus le composé sera actif. Les valeurs d' IC_{50} sont valides et comparables uniquement pour des conditions spécifiques données, car ce paramètre est dépendant des conditions expérimentales telles que la quantité d'enzyme, le mode d'inhibition, ou encore la présence d'antagoniste... La mesure de l' IC_{50} reste néanmoins une donnée fréquemment utilisée pour la comparaison et l'évaluation des inhibiteurs.

Les IC_{50} mesurés révèlent que seul deux des quatre inhibiteurs découverts (12F8 et 3B6) inhibent à la fois l'activité basale et l'activité stimulée ; alors que les composés 19G11 et 2C2 inhibent uniquement l'activité stimulée de MKLP-1. Ces observations suggèrent que les deux inhibiteurs 12F8 et 3B6 affectent le cycle d'hydrolyse d'ATP tandis que les composés 19G11

et 2C2 cibleraient le mécanisme de stimulation ou l'association tubuline / domaine moteur. La molécule 2C2 présente le plus faible IC_{50} (15 μM) des quatre inhibiteurs découverts (**tableau 7**).

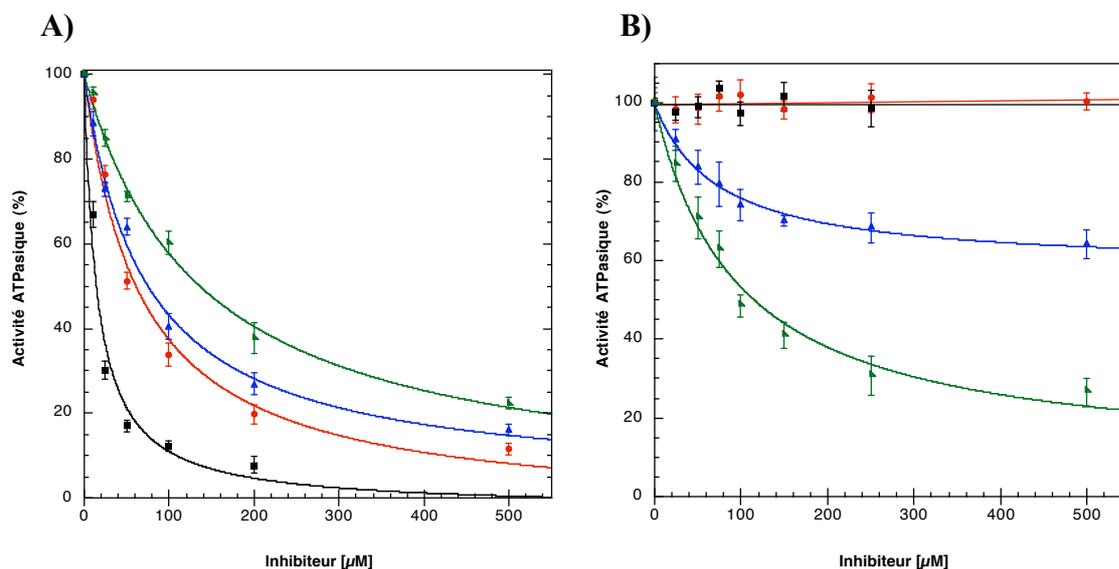


Figure 34 : Inhibition de l'activité ATPasique stimulée (A) et basale (B) de MKLP-1 en fonction de la concentration en inhibiteur. Le composé 19G11 (●, rouge) et 2C2 (■, noir) inhibent uniquement l'activité stimulée alors que les molécules 3B6 (▲, bleu) et 12F8 (▲, vert) inhibent l'activité basale et l'activité stimulée. Expériences réalisées avec 40 nM d'enzyme, 1 mM ATP et 2 μM tubuline dans le cadre des cinétiques stimulées ; et 3 μM d'enzyme et 1 mM ATP pour l'activité basale.

Tableau 7 : Tableau récapitulatif des valeurs d' IC_{50} obtenus à partir des cinétiques des figures 34 et 35. Les IC_{50} ont été déterminés pour les quatre inhibiteurs 19G11, 2C2, 3B6 et 12F8 pour les trois kinésines humaines, MKLP-1, CENP-E et Eg5. (*ni* = non inhibé)

Inhibiteurs	MKLP-1, IC_{50} (μM)		CENP-E, IC_{50} (μM)		Eg5, IC_{50} (μM)	
	- Microtubules	+ Microtubules	- Microtubules	+ Microtubules	- Microtubules	+ Microtubules
19G11	<i>ni</i>	66	<i>ni</i>	113	<i>ni</i>	107
12F8	74	71	271	82	241	85
3B6	110	136	65	231	67	283
2C2	<i>ni</i>	15	<i>ni</i>	19	<i>ni</i>	21

3.3.4. Spécificité

La spécificité d'un inhibiteur pour une protéine est une donnée importante. Elle reflète la capacité pour cette molécule d'inhiber uniquement une seule ou un groupe plus ou moins restreint de protéines. Ainsi, les analogues non hydrolysables d'ATP, comme l'AMP-PNP ou l'AMP-PCP, sont l'exemple d'inhibiteurs non spécifiques affectant une grande majorité des protéines à fonction ATPasique. Il existe déjà de nombreux inhibiteurs capables d'inhiber un large panel de kinésines simultanément, mais les inhibiteurs spécifiques à une kinésine unique sont bien plus rares et sont potentiellement des drogues anticancéreuses dans le cas des kinésines mitotiques. Les inhibiteurs d'enzymes sont des outils fréquemment utilisés en biologie cellulaire, ainsi que dans le cadre d'études fondamentales. Il est aussi courant d'utiliser des inhibiteurs de protéines lors d'études structurales en utilisant leurs capacités à bloquer certaines enzymes dans une conformation particulière. Dans le cadre des kinésines, l'adociasulfate-2 (AS-2) a ainsi été utilisé pour mimer l'interaction kinésine/microtubule (Brier et al., 2006).

La spécificité des quatre inhibiteurs pour MKLP-1 a été testée en confrontant leurs capacités inhibitrices envers deux autres kinésines humaines, Eg5 et CENP-E, appartenant respectivement aux sous-familles 5 et 7. Comme indiqués à la figure 35 et dans le tableau 7, ces quatre composés inhibent également les activités ATPasique de CENP-E et d'Eg5. Ces résultats révèlent un mode d'inhibition non spécifique ; ces quatre molécules étant capables de cibler de façon non préférentielle plusieurs kinésines de sous-familles différentes.

À la connaissance de la non spécificité et des IC_{50} élevés des trois candidats 12F8, 19G11 et 3B6, ces trois inhibiteurs sont écartés de la poursuite des caractérisations. Cette décision est notamment justifiée par l'existence d'inhibiteurs équivalents déjà disponibles et bien plus performants. Par contre, les inhibiteurs uniquement actifs envers l'activité stimulée des kinésines sont peu connus et un seul n'est à ce jour identifié : l'adociasulfate-2 (AS-2). Bien que plus efficace que l'inhibiteur 2C2 avec un IC_{50} de 1 μ M sur l'activité stimulée (Sakowicz et al., 1998), ce composé extrait d'éponges de mer est difficilement purifiable et se révèle complexe quant à sa synthèse chimique. Ainsi, la molécule inhibitrice 2C2, elle aussi spécifique à l'activité stimulée des kinésines, pourrait être un inhibiteur alternatif à l'AS-2 et éveille donc un intérêt suffisant pour étudier plus minutieusement son mode d'inhibition.

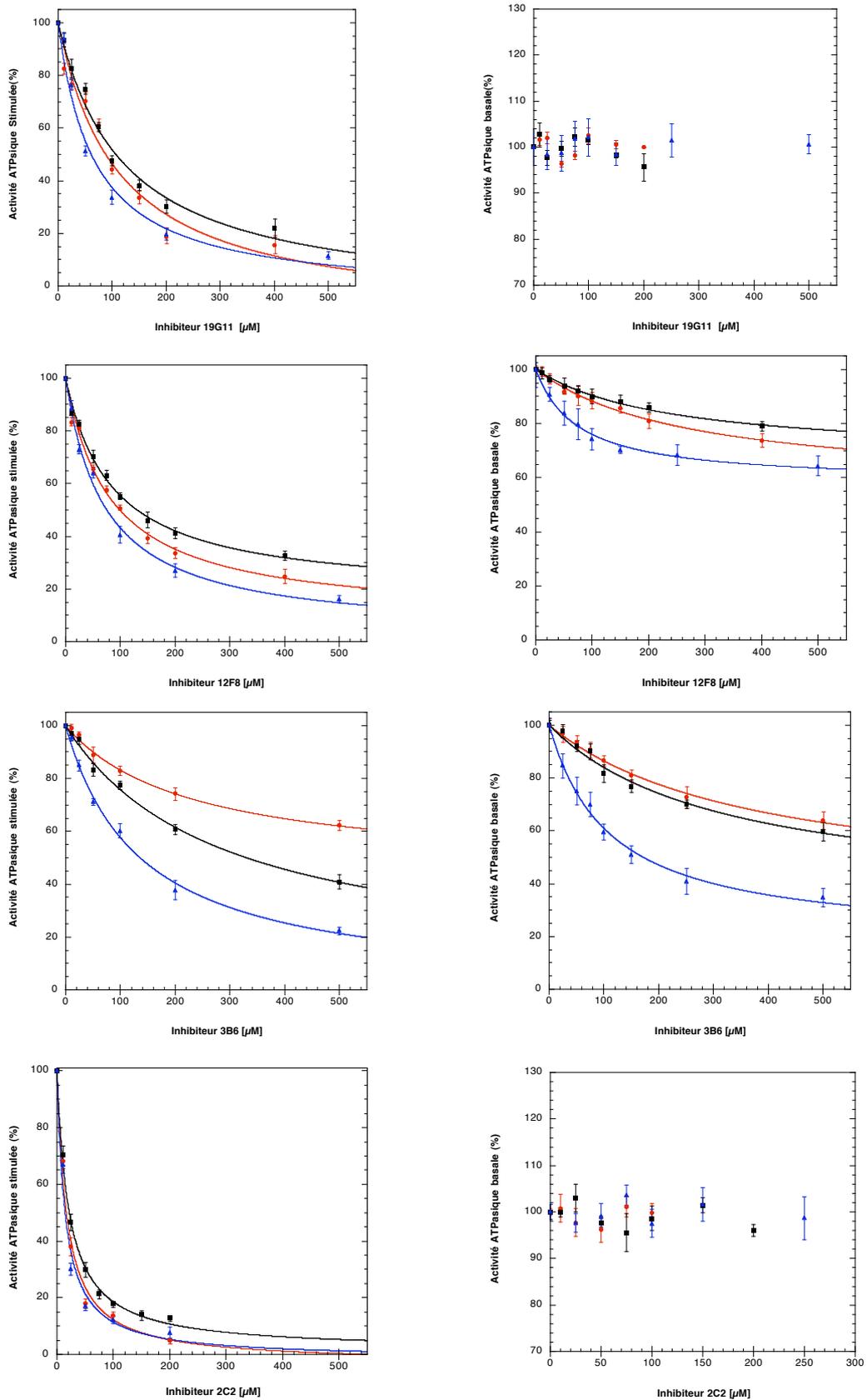


Figure 35 : Spécificité de la capacité inhibitrice des quatre composés 19G11, 12F8, 3B6 et 2C2 envers l'activité ATPasique basale et stimulée du domaine moteur de la kinésines MKLP-1 (▲, bleu), CENP-E (●, rouge) et Eg5 (■, noire).

3.3.5. Caractérisation de l'inhibiteur 2C2

Le composé 2C2 inhibe l'activité stimulée des kinésines testées. Afin de caractériser le type d'inhibition du composé 2C2 vis-à-vis de la stimulation catalytique, j'ai réalisé des mesures cinétiques de l'activité du domaine moteur en fonction de la concentration en microtubules, en présence de 0, 5, 10 ou 15 μM d'inhibiteur 2C2 (**figure 36**). Les deux représentations de l'évolution de l'activité catalytique stimulée sont accessibles à la figure 36 et suggèrent un mode d'inhibition compétitif. En effet, une inhibition compétitive est définie par la préservation de la vitesse maximale malgré des quantités croissantes d'inhibiteurs. La représentation de Lineweaver-Burk (**figure 36-B**) est alors typiquement représentée avec des courbes cinétiques se croisant au niveau de l'axe des ordonnées ($1/[\text{tubuline}] = 0$). Ce point d'intersection correspond alors à la vitesse maximale de l'enzyme ($1/V_{\text{max}}$).

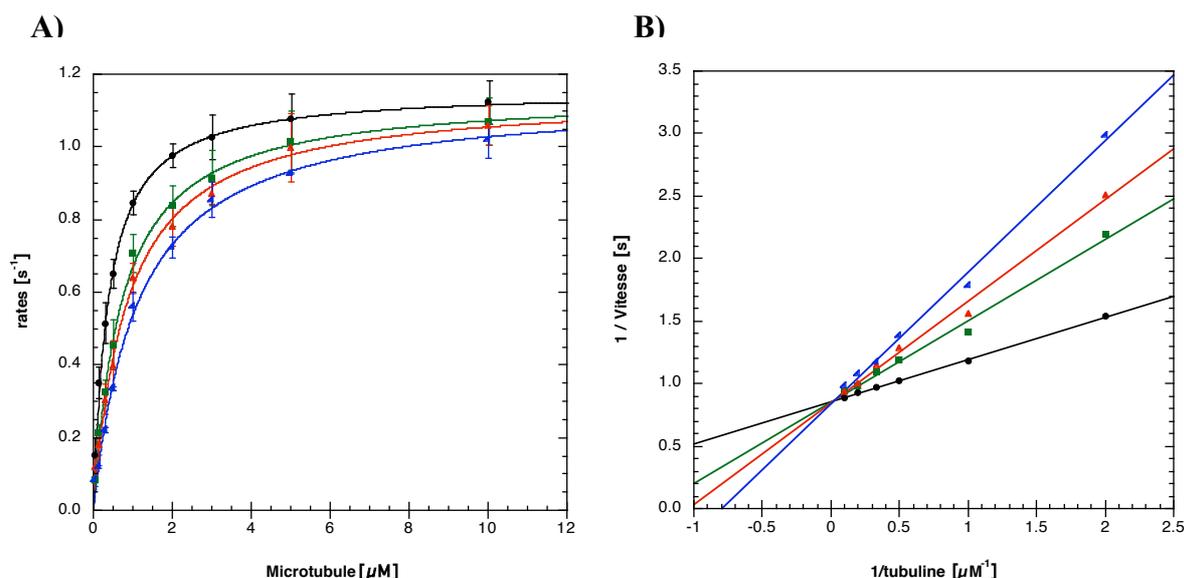


Figure 36 : (A) Représentation de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP en fonction de la concentration en microtubule pour différentes concentrations d'inhibiteur : 0 μM 2C2 (●, noir) 5 μM (■, vert), 10 μM (▲, rouge) ou 15 μM (▲, bleu) de 2C2. (B) Reproduction en double inverse des quatre cinétiques de la figure A.

L'inhibition par compétition, reflète un blocage dû à une concurrence directe entre l'inhibiteur et les microtubules pour le site de fixation au microtubule. Les deux composés sont alors en compétition pour l'accès à un même site d'interaction et y sont l'un l'autre exclusifs. L'équation cinétique de cette inhibition est assimilée à l'équation 6 qui correspond à la courbe d'inhibition compétitive représentée à la figure 36-A. L'équation 7 est représentative des courbes cinétiques de la figure 36-B (représentation de Lineweaver-Buck ou double inverse). Elle correspond à la linéarisation des courbes de la figure 36-A et permet de trancher sans ambiguïté sur le mode d'inhibition. En effet, le graphe 36-B est clairement associé au mode compétitif en raison du croisement des courbes au niveau de l'axe des ordonnées. La vitesse maximale apparente de la réaction est indépendante de la concentration en inhibiteur, mais l'affinité de l'enzyme pour les microtubules diminue car ce dernier ne peut pas se lier au complexe enzyme-inhibiteur. De plus, dans ce type d'inhibition, la vitesse maximale apparente correspond à la vitesse maximale (*Eq 7*).

$$V = \frac{V_m \cdot [MT]}{[MT] + K_{0.5,MT} (1 + [I]/k_i)} \quad \text{Eq. 6}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{max}} + \frac{1}{[MT]} \cdot \frac{K_{m-app}}{V_{max}} \quad \text{Eq. 7}$$

$$\frac{K_{m-app}}{V_{max}} = \frac{K_{0.5,MT} (1 + [I]/k_i)}{V_{max}} \quad \text{Eq. 8}$$

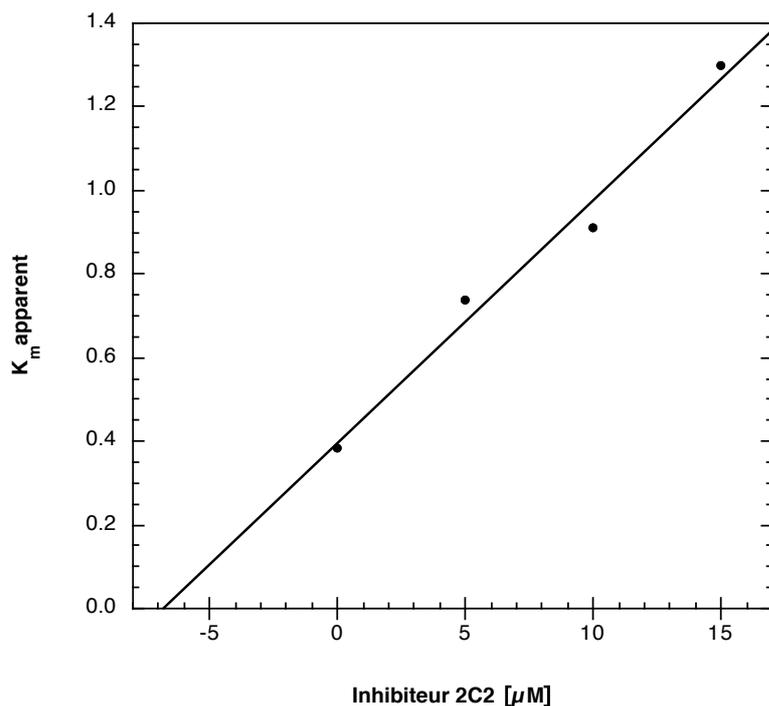


Figure 37 : Représentation de l'évolution du K_m apparent en fonction de la concentration en inhibiteur 2C2. L'interception de la droite avec l'axe des abscisses (où la concentration en inhibiteur est égale à $-K_i$ selon l'Eq. 8) permet alors d'estimer la constante d'inhibition. Le K_i ainsi mesuré est de $6.8 \mu\text{M}$ pour le composé 2C2. De plus, la constante d'affinité de l'enzyme pour les microtubules peut être déterminée à l'ordonnée à l'origine ($K_{0.5, \text{MT}} = 390 \text{ nM}$).

La détermination de la constante d'affinité de l'enzyme pour les microtubules ($K_{0.5, \text{MT}}$) et de la constante d'inhibition (K_i) du composé 2C2 sont accessibles à partir du graphe de la figure 37. Ainsi, Selon l'interprétation de l'équation 8, la mesure du K_i à l'interception de la droite avec les abscisses (**figure 37**), indique une constante d'inhibition pour le composé 2C2 de $6.8 \mu\text{M}$. De plus, conformément à la caractérisation du domaine moteur MKLP-1₁₋₄₄₉ (tableau 6, page 84) on peut mesurer un $K_{0.5, \text{MT}}$ de 390 nM , alors du même ordre de grandeur précédemment observée (295 nM). De la même manière, la vitesse maximale de MKLP-1₁₋₄₄₉ accessible à la figure 36 (1.17 s^{-1}) confirme celle déjà présentée dans le tableau 6 pour le même domaine moteur (1.4 s^{-1}).

3.4. Interaction « centralspindlin complex » / tubuline

3.4.1. Historique

Le « centralspindlin complex » et notamment MKLP-1 sont fréquemment impliqués dans des processus d'agrégations de microtubules à polarités inversée, sans que l'on connaisse le mécanisme de pontage mis en jeu. La capacité à fixer et relier les polymères de tubuline a déjà été étudiée chez plusieurs kinésines et différents mécanismes ont déjà pu être éclaircis. C'est par exemple le cas d'Eg5, une kinésine homotétramérique bipolaire capable de marcher simultanément sur deux microtubules avec une paire de domaines moteurs sur chacune de ses extrémités (Kashina et al., 1996a ; Kashina et al., 1996b). Il a aussi été remarqué des interactions domaine « queue » / tubuline chez différentes kinésines comme HsCENP-E ou DmNcd (Karabay et Walker, 1999a ; Karabay et Walker, 1999b ; Liao et al., 1994).

Différentes hypothèses sur le mécanisme de pontage de microtubules par le « centralspindlin complex » ont été avancées, mais aucun travail n'a encore détaillé les interactions mises en jeu par ce complexe. La région « cou » particulièrement longue de MKLP-1 (104 résidus contre moins d'une dizaine en général) pourrait permettre suffisamment de flexibilité aux deux domaines moteurs pour capturer et ponter deux microtubules dans un environnement proche (Pavicic-Kaltenbrunner et al., 2007). De même, rien n'exclue que d'autres sites additionnels de reconnaissance de la tubuline, puissent être présent au sein de MgcRacGAP ou de MKLP-1. C'est ainsi que j'ai entrepris d'établir les profils d'interactions aux microtubules de plusieurs constructions de MKLP-1 et de MgcRacGAP.

3.4.2. Interaction du domaine queue avec les microtubules

L'interaction des trois constructions MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇, avec les microtubules ont été examinées par des expériences de co-précipitations. Une gamme de concentration de chacune de ces trois constructions de la « queue » de MKLP-1, a été mise en présence de 50 mM de NaCl et de 2 μ M de tubulines polymérisées avec taxol. Après centrifugation et sédimentation du mélange, les surnageants et les culots sont déposés sur gel SDS-PAGE afin d'évaluer la capacité d'interaction des fragments « queue » avec les microtubules (**figure 38**). Il résulte de ces expériences que les trois constructions MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ co-précipitent avec les microtubules, et le domaine « queue » est suffisant pour cette fixation avec la tubuline.

J'ai pu estimer les constantes de dissociation (K_d) du complexes « queue » / microtubule. Pour cela, j'ai mesuré la quantité de MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ dans les surnageants et culots respectifs de chaque co-précipitation, en utilisant une gamme étalon interne et le programme d'indexation ImageJ ; j'ai ensuite tracé l'évolution des fractions de protéines liées aux microtubules à celles non liées (**figure 39**). Les K_d estimées par cette méthode sont de 0.45 μ M, 0.58 μ M et 0.44 μ M pour les fragments MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ (**tableau 8**).

La capacité de fixation maximale (B_{max}) est autour de 8 μ M avec des B_{max} respectifs de 7.4 μ M, 8.0 μ M et 9.0 μ M pour MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ (**tableau 8**). Les expériences ont été réalisées en présence de 2 μ M de dimères tubulines, ce qui porte le ratio « queue » / tubuline à 4 : 1. Il y aurait donc très probablement deux fragments C-terminaux de MKLP-1 par sous unité α et β de la tubuline. À titre d'exemple, le domaine « queue » de la kinésine Ncd qui lui aussi interagit avec les microtubules, présente un profil de fixation similaire avec un ratio de 4 : 1. La représentation selon Scatchard du graphe de la figure 40 permet elle aussi d'estimer les B_{max} et les constantes de dissociation. De plus, l'évolution du rapport de populations [lié] / [libre] en fonction de la fraction de protéines liées est linéaire (**figure 40**). Cette linéarité nous permet de conclure que la région C-terminale de MKLP-1 possède une seule composante de sites d'interaction car s'il co-existe plusieurs sites avec des K_d différents, la représentation de Scatchard serait alors curviligne).

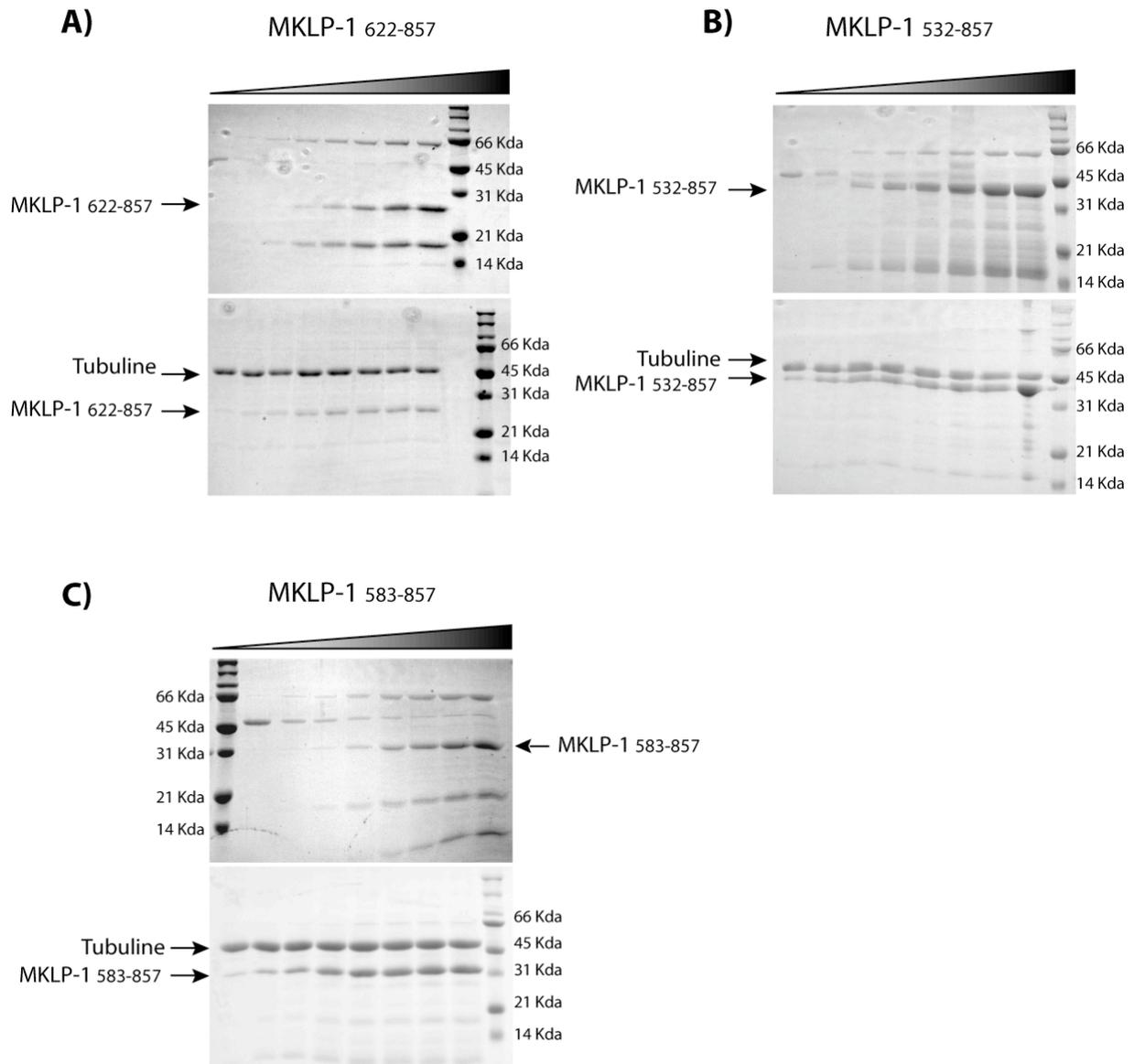


Figure 38 : Expériences de co-précipitations des microtubules avec des gammes de concentrations croissantes de MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ (0 à 15 μ M final). MKLP-1 est mélangé à 2 μ M de tubulines polymérisées (taxol) et centrifugé après 20 minutes d'incubation. **(A)** Expérience de co-précipitation avec MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇. Le gel du haut correspond aux dépôts des surnageants pour huit expériences de co-précipitation (1 à 15 μ M de MKLP-1). Le gel en dessous présente les dépôts des culots respectifs obtenus après sédimentation des microtubules. La tubuline et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ sont indiqués par une flèche. **(B)** Expérience équivalente pour la construction MKLP₅₃₂₋₈₅₇. **(C)** Expérience équivalente pour le fragment MKLP₅₈₃₋₈₅₇.

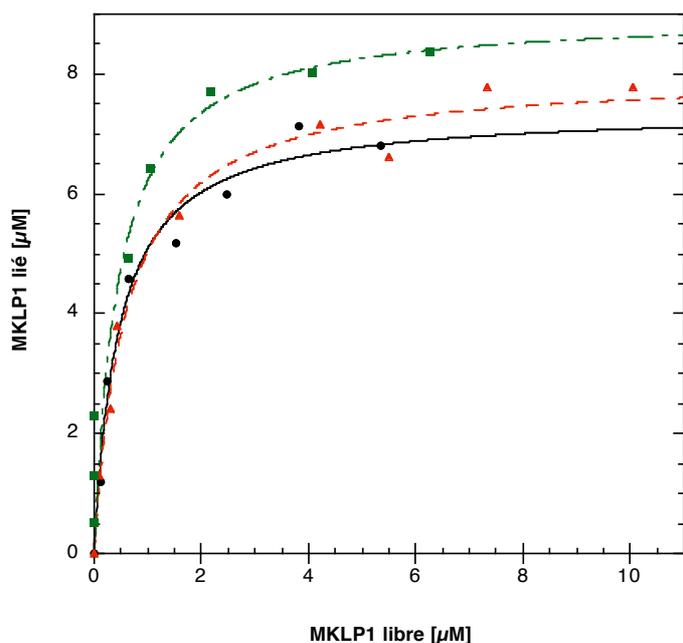


Figure 39 : Les concentrations de MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇ (●, noir), MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ (▲, rouge) et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ (■, vert) partagées entre une population libre ou liée aux microtubules, sont mesurées à partir de l'intensité des bandes de la figure 38. Le tracé de ces deux populations est modélisé par une équation quadratique permettant d'estimer la constante de dissociation du complexe MKLP-1/tubuline ainsi que la capacité de liaisons maximales (Eq. 4, page 63). Les capacités de fixations maximales et les constantes de dissociation sont présentées dans le tableau 8. (Expérience réalisée avec 2 µM de tubuline polymérisé en présence de taxol)

Tableau 8 : Données extraites à partir du graphe de la figure 39. Sont présentées les constantes de dissociation (K_d) de l'interaction de MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ avec les microtubules. Le B_{max} permet d'estimer le ratio MKLP-1/tubuline (expérience avec 2 µM de tubuline).

Constructions de MKLP-1	K_d [µM]	B_{max} [µM]	Ratio queue:MT
MKLP-1 ₅₃₂₋₈₅₇	0.45	7.4	4 : 1
MKLP-1 ₅₈₃₋₈₅₇	0.58	8.0	4 : 1
MKLP-1 ₆₂₂₋₈₅₇	0.44	8.9	4 : 1

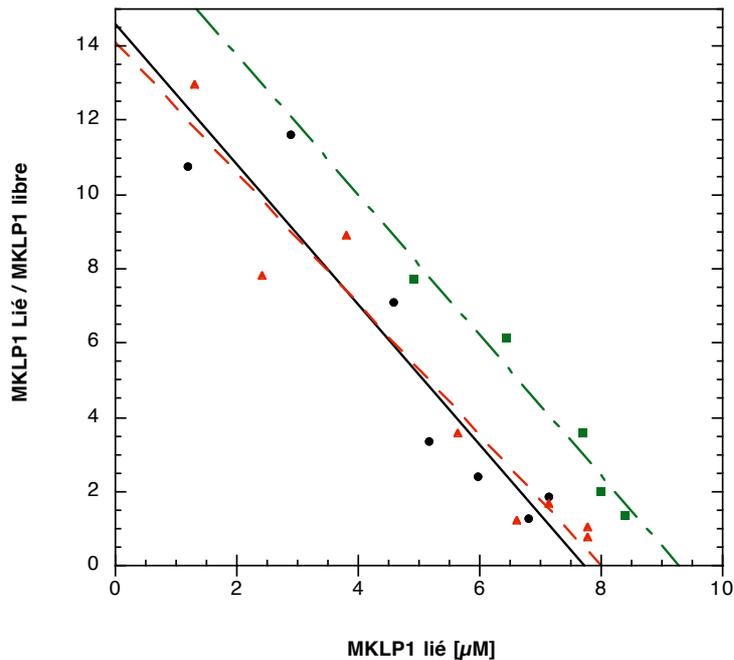


Figure 40 : Représentation de Scatchard de la partition des populations de protéines libres ou liées aux microtubules. L'évolution du rapport de protéines [lié] / [libre] en fonction de la fraction liée aux microtubules est linéaire pour MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇ (●, noir), MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ (▲, rouge) et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ (■, vert). On peut déterminer graphiquement les valeurs de B_{\max} sur l'intersection des droites avec les abscisses, tandis que la pente des courbes correspond $-1/K_d$. On peut ainsi mesurer à partir du Scatchard des constantes de dissociation équivalentes à celles qui sont obtenues *via* la modélisation de la figure 39. (K_d respectif de MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ : 0.52, 0.56 et 0.53 μM ; B_{\max} respectif de MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇ : 7.8, 8.0 et 9.3 μM).

À titre indicatif, il a aussi été mis en évidence des interactions « queue » / tubuline chez les kinésines KatC (Jiang et al., 2007), Kid (Shiroguchi et al., 2003) et Ncd (Karabay et Walker, 1999a) pour lesquelles les constantes de dissociation sont de 5 μM , 12 μM et 0.13 μM .

a. Dépendance nucléotidique du complexe « queue »/tubuline

Le site de liaison aux microtubules du domaine moteur est connu pour avoir une affinité envers la tubuline dépendante de l'état nucléotidique du cycle ATPasique de la kinésine (Rosenfeld et al., 1996). En général, les sites additionnels capables d'interactions avec les microtubules ne sont pas dépendant du cycle catalytique, ni influencés par la présence d'ATP. Parmi les cas recensés de kinésines contenant un second site de fixation à la tubuline, aucune influence nucléotidique n'a encore été soulevée. J'ai entrepris de vérifier l'effet des nucléotides sur la reconnaissance des microtubules par la « queue » de MKLP-1. J'ai ainsi réalisé des expériences de co-précipitations avec une gamme de concentration croissante de MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇, en présence de 2 μM de tubuline et de 1 mM d'AMP-PNP (analogue non hydrolysable de l'ATP), d'ADP, ou sans nucléotide. La figure 41 rend compte du partage de MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ en une population libre ou liée aux microtubules. Les constantes de dissociation extraites de cette courbe (**tableau 9**) indiquent qu'en présence d'AMP-PNP ou d'ADP, le domaine « queue » conserve sa capacité d'interaction avec un $K_d^{\text{AMP-PNP}}$ de 0.30 μM et un K_d^{ADP} équivalent avec 0.35 μM . Si l'on compare ces deux constantes de dissociation, à celles obtenues en absence de nucléotide (**tableau 8**), il n'apparaît pas de variation significative ($K_d^{\text{no nucléotide}}$ respectifs pour MKLP-1₅₃₂₋₈₅₇, MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ et MKLP-1₆₂₂₋₈₅₇,: 0.45, 0.58 et 0.44 μM). De plus, la capacité de fixation maximale reste de 8 μM dans ces conditions expérimentales, indiquant la conservation d'un ratio « queue » / tubuline de 4 pour 1.

D'après ces résultats (**figure 41**), il apparaît donc que le profil de reconnaissance du second site de liaison aux microtubules de MKLP-1 est nucléotide indépendant. Cette conclusion est homogène avec les caractérisations d'autres sites additionnels de fixation à la tubuline recensés chez les kinésines. Il a cependant été montré dans certains cas que ces interactions « queue » / tubuline sont parfois sous la dépendance d'une phospho-régulation (Liao et al., 1994).

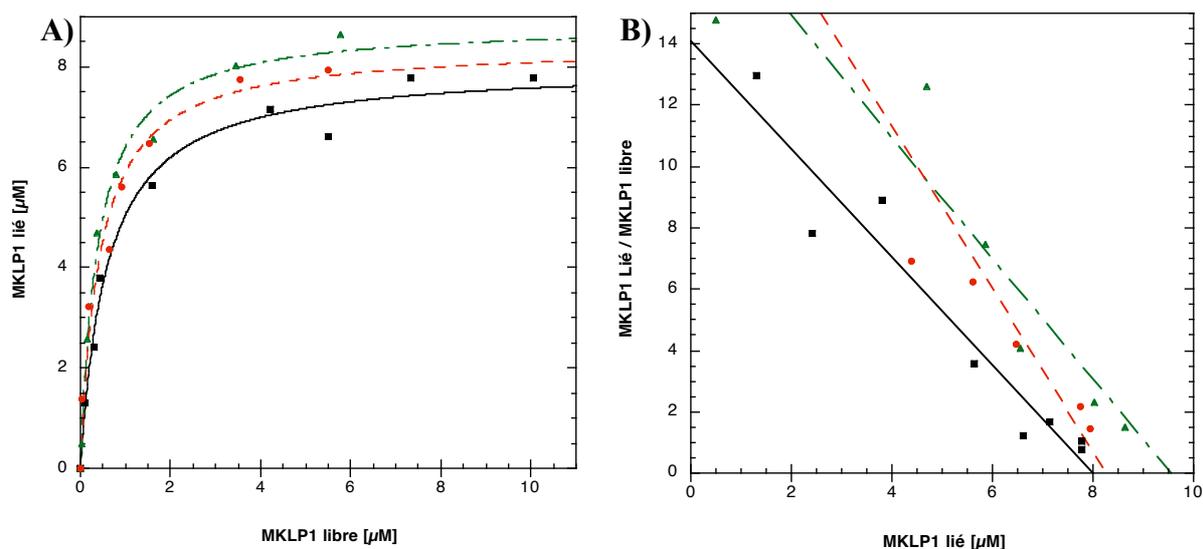


Figure 41 : Effet des nucléotides sur l'interaction « queue » / tubuline. **(A)** Le graphe représente la partition de MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ entre une population liée aux microtubules ou libre ; en présence d'AMP-PNP (▲, vert), d'ADP (●, rouge) ou sans nucléotide (■, noir). Les points sont mesurés à partir d'expériences de co-précipitation de MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ (1 à 15 μM MKLP-1 final) avec 2 μM de tubuline. Les culots et surnageants sont analysés par SDS-PAGE, et l'intensité des bandes de protéines est déterminée après numérisation avec le logiciel ImageJ. Les points sont modélisés avec une équation quadratique pour estimer les constantes de dissociation (K_d) et la fixation maximale (B_{max}) en fonction de l'état nucléotidique (tableau 6). **(B)** Représentation selon Scatchard du graphe A.

Tableau 9 : Données extraites à partir du graphe de la figure 41-A. Sont présentés les B_{max} et les constantes de dissociation de la formation du complexe MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇/ microtubules (2 μM de tubuline).

Constructions de MKLP-1	K_d [μM]	B_{max} [μM]	Ratio (queue :MT)	Nucléotide
MKLP-1 ₅₈₃₋₈₅₇	0.58	8.0	4 : 1	Sans nucléotide
MKLP-1 ₅₈₃₋₈₅₇	0.38	8.8	4 : 1	AMP-PNP
MKLP-1 ₅₈₃₋₈₅₇	0.42	8.4	4 : 1	ADP

b. Effets du sel sur la formation du complexe « queue »/tubuline

À la différence de l'expérience précédente, j'ai déterminé l'effet de la salinité sur la reconnaissance des microtubules par MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇. Les co-précipitations de la construction MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ sont réalisées comme précédemment mais avec 50, 120, 200 puis 400 mM de NaCl. Le partage du domaine « queue » de MKLP-1 sous forme libre ou liée aux microtubules est mesuré comme précédemment afin d'établir les courbes de la figure 42. Il apparaît clairement que le sel diminue l'affinité du complexe par un écrantage des charges. Ce résultat suggère que la reconnaissance « queue » / tubuline est principalement guidée par des interactions de type électrostatique.

La « queue » de MKLP-1 possède un point isoélectrique basique (pI = 10.3) ce qui est fréquent chez de nombreuses protéines associées aux microtubules (MAP) interagissant avec des résidus acides de la tubuline (Lewis et al., 1988). Contrairement à MKLP-1, le domaine « queue » de la kinésine CENP-E est capable d'interagir pleinement avec la tubuline malgré de fortes concentrations salines allant jusqu'à 2 M NaCl (Liao et al., 1994).

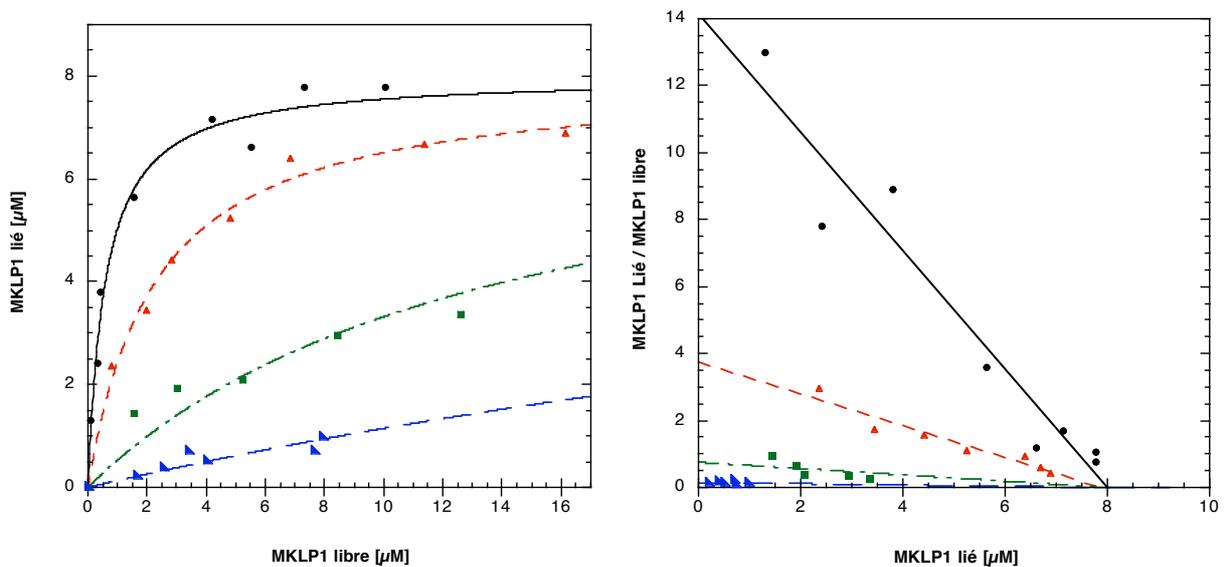


Figure 42 : Effet du NaCl sur la fixation de MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ avec les microtubules. (A) La courbe représente la partition de MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ entre une population libre ou liée aux microtubules ; en présence de 50 mM (●, noir), 120 mM (▲, rouge), 200 mM (■, vert) ou 400 mM (▲, bleu) de NaCl. Les points sont mesurés à partir de co-précipitations de MKLP-1₅₈₃₋₈₅₇ avec 2 μM de tubulines polymérisées. (B) Représentation de Scatchard du graphe A.

3.4.3. Interaction MgcRacGAP / microtubule

J'ai montré que l'extrémité C-terminale de MKLP-1 est capable de se fixer à la tubuline, permettant ainsi à MKLP-1 d'interagir avec le cytosquelette sur ces extrémités N et C terminales. Pour dresser un modèle précis de l'association « centralspindlin » / MT au sein du « corps intermédiaire », il est donc nécessaire de vérifier le profil d'interaction de MgcRacGAP avec les microtubules.

Des expériences de co-précipitations avec la protéine MgcRacGAP ont donc été réalisées avec la construction entière MgcRacGAP₁₋₆₃₂. La protéine ayant tendance à précipiter en partie lors de l'étape de centrifugation à 100 000 rcf, j'ai effectué les expériences de co-précipitations en maintenant la concentration de MgcRacGAP₁₋₆₃₂ constante (5 μ M) pour une gamme de 0 à 40 μ M de tubulines polymérisées (**figure 43**). On constate sur la figure 43, que la fraction de MgcRacGAP dans le culot n'évolue pas malgré les quantités croissantes de tubulines présentes. Il en résulte que la protéine MgcRacGAP est incapable d'interagir avec les microtubules et que le pontage des polymères de tubuline au niveau du « corps intermédiaire » ne fait pas intervenir MgcRacGAP en tant que site d'ancrage.

Des expériences de co-précipitations antérieures réalisées à partir d'extraits de cellules Héla mitotiques, ont montré que la région N-terminale de MgcRacGAP (résidus 1 à 106) était capable de co-précipiter avec la tubuline (Hirose et al., 2001). Il fut ensuite montré que cette même région intervenait dans la formation du « centralspindlin complex » avec la kinésine mitotique MKLP-1 (Mishima et al., 2002). Il est désormais permis d'affirmer que MgcRacGAP ne possède pas de site de fixation pour la tubuline et que sa capacité à co-précipiter avec les microtubules à partir d'extrait cellulaire, est la conséquence de son affinité élevée pour MKLP-1.

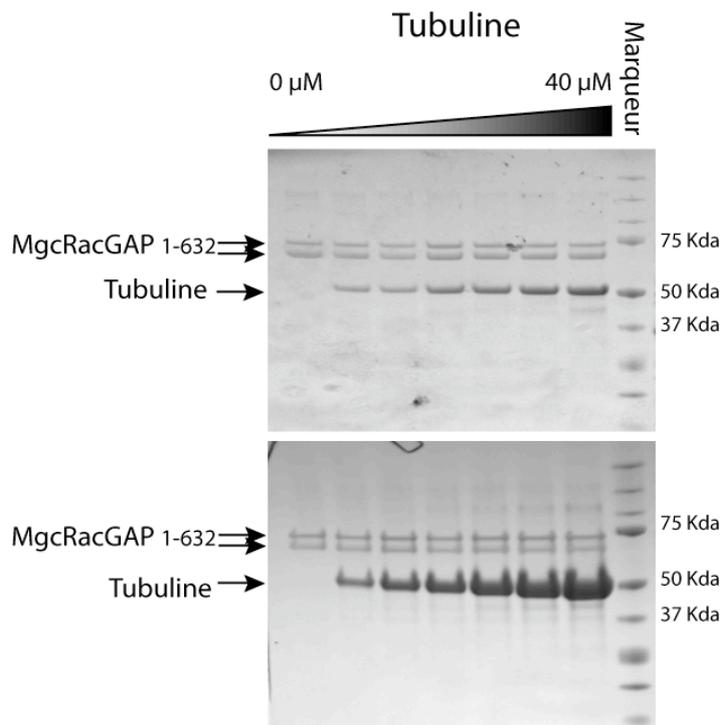


Figure 43 : Expérience de précipitation de la tubuline en présence de MgcRacGAP₁₋₆₃₂. Une gamme de concentration de microtubules (0 à 40 μ M tubuline) est incubée pendant 20 minutes à 22 °C, puis centrifugée à 100.000 rcf. Les culots et les surnageants sont analysés par SDS-PAGE. Le gel du haut correspond aux dépôts des surnageants et celui en dessous aux dépôts des culots de microtubules. La tubuline et MgcRacGAP₁₋₆₃₂ sont indiquées par une flèche ; MgcRacGAP présente une bande de dégradations elle aussi indiquée. Malgré des quantités croissantes de tubuline, il n'y a aucune accumulation de MgcRacGAP₁₋₆₃₂ dans les culots.

Chapitre 4

DISCUSSION

4.1. Expression et cristallogenèse de MKLP-1 et MgcRacGAP

Mu par l'objectif d'obtenir la structure de la kinésine MKLP-1, j'ai réalisé de nombreux clonages dans le but d'obtenir des fragments cristallisables. En raison de la taille importante de cette protéine ou de ses domaines isolés, la méthode de résonance magnétique nucléaire (RMN) n'était pas appropriée à l'étude de MKLP-1. Envisagé au début de la thèse, le projet de l'étude structurale à moyenne résolution du complexe MKLP-1/microtubule par cryo-microscopie électronique a été abandonné à la suite de la publication d'un travail similaire (Hizlan et al., 2006). Cette étude dresse un modèle du complexe MKLP-1/MT à 25 Å de résolution, reflétant le caractère particulièrement labile et flexible de la fixation de la tubuline par MKLP-1 (la reconstruction tridimensionnelle est basée sur la moyenne d'un grand nombre d'images, or les orientations multiples et hétérogènes au sein d'un complexe limitent la résolution). À titre de comparaison, il est désormais courant d'établir par cette méthode des enveloppes de complexes kinésine/tubuline proche de 10 Å de résolution ; pour lesquelles les degrés de liberté entre la kinésine et la tubuline sont plus restreints que dans le cas de MKLP-1 (Hoenger et Gross, 2008).

Malgré une forte homologie de structure entre les domaines moteurs de kinésines, la caractérisation structurale de MKLP-1 reste cruciale pour élucider le rôle de la large insertion unique à la sous-famille 6. Dans cette sous-famille, la boucle L6 est singulière aux autres kinésines en raison d'une large insertion de 80 résidus au sein de la boucle L6, alors qu'elle ne fait que quelques résidus de long en général. Encore aucune structure de kinésine de cette sous-famille n'a pu être résolue et les implications de cette boucle caractéristique sont encore inconnues. Si la cristallographie semble la meilleure méthode pour déterminer la structure atomique de MKLP-1, les dégradations protéolytiques subies par la boucle L6 desservent l'approche cristallographique employée. En effet, l'hétérogénéité engendrée par la protéolyse, couplée à la flexibilité potentielle de cette large boucle est un obstacle à la cristallisation. De plus, comme l'indiquent les travaux d'Hizlan (2006), la région « cou » de MKLP-1 permet une grande liberté de mouvement entre le domaine moteur et la super-hélice, soutenant alors l'idée que l'étude cristallographique de MKLP-1 par domaines isolés est la plus judicieuse. Néanmoins, cette stratégie ne s'est pas montrée payante même après la mutation de la boucle protéolysée et la diversification de l'étude structurale au domaine « queue » et à la protéine partenaire MgcRacGAP. Face à cet échec, il est dorénavant envisagé de poursuivre cette étude structurale en s'attardant sur le « centralspindlin complex » par diffusion de neutrons aux

petits angles. Cette technique ne nécessite pas de cristaux et permet à l'instar de la cryo-microscopie électronique, de déterminer l'enveloppe des complexes protéiques tel que le complexe MKLP-1 / MgcRacGAP.

Au final, malgré l'insuccès des essais de cristallogénèse, les nombreuses constructions exprimées pour le projet structural m'ont fourni autant de supports disponibles pour rebondir sur l'aspect fonctionnel de MKLP-1 et de MgcRacGAP. J'ai pu ainsi mettre à profit les différents domaines exprimés dans une caractérisation enzymatique des domaines moteurs sauvages et mutants de la boucle L6. De plus, la kinésine mitotique MKLP-1 étant une cible potentielle pour des drogues à visées antimitotiques, j'ai pu orienter une partie de mes travaux dans le cadre d'un criblage de chimiothèques, basé sur l'activité catalytique du domaine moteur. Le domaine C-terminal d'interaction aux cargos de la kinésine MKLP-1, et les constructions solubles de MgcRacGAP ont aussi pu être utilisés afin de mieux comprendre la capacité d'agrégation des microtubules, attribué au complexe MKLP-1/MgcRacGAP.

4.2. La boucle L6 de MKLP-1

Les courbes de cinétiques du domaine mutant prouvent que le remplacement de la boucle L6 par une séquence plus courte mimant celle de la kinésine conventionnelle (Kif5B), n'entrave pas la fonction catalytique de MKLP-1. En effet, l'alignement des paramètres cinétiques (V_{\max} et $K_{m,ATP}$) du domaine moteur sauvage et de sa version mutante indique que le site catalytique de MKLP-1_{1-449_L6_KHC} est correctement agencé. Les expériences montrent que la mutation n'entraîne pas de défaut dans le repliement de la poche catalytique de l'hydrolyse de l'ATP ; le domaine moteur conservant alors un repliement viable. Ce résultat tend à confirmer l'exactitude et la précision des estimations menant à la localisation de la boucle L6 à partir de l'alignement de séquence présenté à la figure 26 (page 81). La large insertion de boucle L6 ne devrait pertinemment pas se loger dans le cœur hydrophobe de la protéine, mais au contraire être à l'interface. La sensibilité à la protéolyse localisée sur cette insertion (tableau 4, page 74) va dans ce sens et confirme une forte accessibilité de cette boucle au solvant. Il semble pertinent et raisonnable de juger du comportement de la construction mutante MKLP-1_{1-449_L6_KHC} comme un modèle viable, reflétant l'influence de la perte de cette large insertion singulière à MKLP-1.

La confrontation des cinétiques des deux domaines moteurs, sauvage et mutant, souligne une différence majeure entre les deux protéines quant à l'affinité pour les microtubules (tableau 6, page 84). En effet, la comparaison des courbes de la figure 30 (page 86), indique que le remplacement de la boucle L6 de MKLP-1 (80 acides aminés) par la boucle L6 de KIF5B (5 acides aminés), améliore significativement la capacité de reconnaissance du domaine moteur envers les polymères de tubuline ($K_{0.5, MT}$ de 39 nM pour MKLP-1_{1-449_L6_KHC} et 294 nM pour la construction sauvage). L'agencement de cette boucle provoque alors une contrainte à l'origine d'un amoindrissement d'un facteur 8 sur l'affinité du domaine moteur pour les microtubules. Néanmoins, il est important de relever que les différents modèles couplant les structures atomiques à hautes résolutions avec les enveloppes de complexe kinésine/tubuline, placent la boucle L6 sur la face du domaine moteur non exposée au microtubule (**figure 44**) (Hirose et al., 2006 ; Kikkawa et Hirokawa, 2006).

La boucle L6 n'étant pas localisée sur la face de la kinésine en contact avec l'interface du microtubule, on peut supposer que la contrainte exercée par la boucle L6 sur l'affinité du moteur pour la tubuline, n'est probablement pas d'un type stérique de la boucle vers la tubuline, mais le résultat d'une perturbation indirecte. Néanmoins, l'importance de l'insert de la boucle L6 caractéristique de la sous-famille 6 avec ses 80 résidus (4 résidus pour Eg5 et CENP-E, et 5 chez KIF5B) serait suffisamment longue pour pouvoir pointer vers l'interface du domaine moteur avec la tubuline. La boucle L6 de MKLP-1 diminue donc l'affinité du domaine moteur pour les microtubules. Cependant, la caractérisation enzymatique ne peut déterminer si cette boucle est capable de contrarier le site de reconnaissance dédié à la tubuline *via* un prolongement vers l'interface kinésine/tubuline, ou si son repliement peut induire une gêne (voire une régulation de cette reconnaissance) en l'influençant indirectement par des changements structuraux. Un début de réponse serait certainement apporté par une étude structurale ou des expériences d'échange H^1 / D^2 couplé à la spectrométrie de masse, menées comparativement entre les domaines moteurs sauvages et mutants (Katta et Chait, 1991).

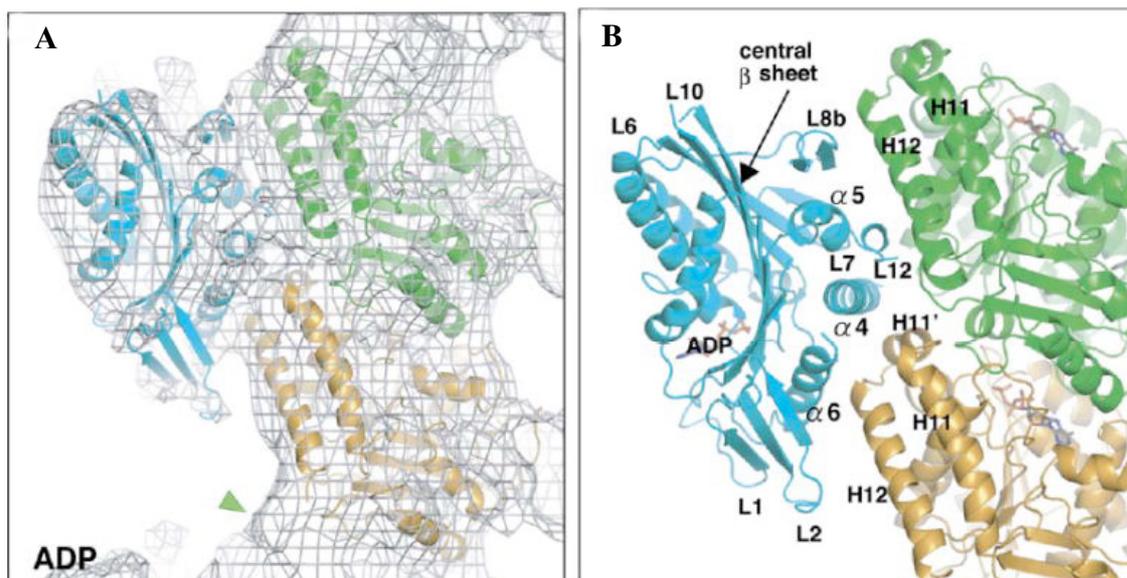


Figure 31 : Organisation du complexe de la kinésine Kar3 avec la tubuline, dans l'état ADP. **(A)** Modélisation des structures cristallographiques du domaine moteur de la kinésine Kar3 (cyan), de la α -tubuline (jaune) et de la β -tubuline (vert) dans une carte de densité obtenue par cryo-microscopie électronique et reconstruction tridimensionnelle. **(B)** Représentation en ruban de la structure cristallographique du complexe, et indication des éléments structuraux. La boucle L6 est localisée sur la face opposée à la tubuline. D'après Hirose et *al.*, (2006).

4.3. L'inhibiteur 2C2

Le criblage de 6880 molécules originaires de quatre chimiothèques fournies par l'Institut de Chimie et des substances naturelles (ICSN), l'Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires (ICBMS) et le National Cancer Institute (NCI/NIH) ont finalement permis de trouver quatre inhibiteurs dont un est sensiblement plus relevant : le composé 2C2. La molécule 2C2 inhibe la stimulation de l'activité ATPasique des kinésines MKLP-1, Eg5 et CENP-E de façon efficace pour une concentration de l'ordre du micromolaire (IC_{50} de $15 \mu M$). Inhibiteur compétitif, le composé 2C2 pourrait être une alternative au seul autre inhibiteur compétitif avec les microtubules, connu pour les kinésines : l'adociasulfate-2 (AS-2). L'AS-2 bloque la stimulation catalytique en mimant les microtubules dans le site de reconnaissance de la tubuline au sein des domaines moteurs de kinésines (Reddie et al., 2006). Plus affiné, l'AS-2 possède une constante d'inhibition de $0.8 \mu M$ tandis que le composé 2C2 présente une constante d'inhibition supérieure avec un K_i de

6.8 μM . Néanmoins, la complexité chimique de l'AS-2 rend sa synthèse chimique trop complexe et onéreuse, et son extraction à partir *Haliclona* (éponge de mer) n'est plus réalisée en raison du faible rendement de purification. Moins actif que l'AS-2, le composé 2C2 peut néanmoins se révéler un substitut intéressant, compensant la rareté et l'indisponibilité de l'AS-2. De plus, il est possible d'essayer d'accroître l'efficacité du composé 2C2 en testant et synthétisant des molécules analogues pouvant alors être plus affines pour les kinésines.

Ce type d'inhibiteur compétitif nourrit un intérêt dans son application en physiologie cellulaire en tant que drogue « anti-transport » permettant de sonder la fonction des kinésines (Ewald et al., 2001 ; Holzinger et Lutz-Meindl, 2002). De plus, la capacité de ce type de molécules à mimer l'interaction kinésine/microtubule peut fournir un nouvel instrument dans la compréhension du mécanisme de stimulation des kinésines (Brier et al., 2006).

Cependant, l'inhibition de la stimulation ATPasique de MKLP-1 en présence du composé 2C2 nécessite encore une investigation sur la cible de cet inhibiteur. En effet, les expériences de cinétiques enzymatiques ne permettent pas d'identifier la molécule 2C2 comme un inhibiteur de kinésine. Une incertitude persiste encore sur le site reconnu par cette petite molécule de 426 Da. L'inhibiteur 2C2 étant sans influence sur l'activité basale, nous ne pouvons écarter l'hypothèse que cette molécule se fixe sur la tubuline (sans affecter sa dynamique de polymérisation-dépolymérisation) ; elle bloquerait alors l'association du domaine moteur sur le microtubule, inhibant ainsi la formation du complexe et de la forme stimulée de la kinésine.

Afin de pouvoir apporter une réponse sur la cible du composé 2C2, l'utilisation de techniques biophysiques est indiquée pour ce type de caractérisation. Ainsi, la confirmation d'une interaction entre le domaine moteur et le composé 2C2 pourrait se vérifier par résonance plasmonique de surface (Stenlund et al., 2006) ou par calorimétrie isotherme à titration (Perozzo et al., 2004), deux techniques fréquemment utilisées dans l'étude d'interactions protéines / ligands. Nécessitant le marquage isotopique de la protéine, la RMN serait aussi une méthode alternative possible pour vérifier une interaction potentielle de la kinésine avec la molécule 2C2 (DeBonis et al., 2003).

4.4. Modèle de l'interaction « centralspindlin complex » / microtubules

Le « centralspindlin complex » est nécessaire à l'évolution de la cytokinèse. Il a été montré que cet élément essentiel à l'abscission des deux cellules filles est impliqué dans la régulation du sillon central et dans l'agrégation des microtubules polaires anaphasiques (Gromley et al., 2005 ; Werner et al., 2007). Le complexe MKLP-1/MgcRacGAP tend à se localiser en cours d'anaphase dans cette zone de chevauchement des microtubules et va participer à la formation du « corps intermédiaire ».

Pour mieux cerner la capacité du « centralspindlin complex » à établir des pontages entre microtubules antiparallèles, j'ai utilisé différentes constructions de MKLP-1 et de MgcRacGAP afin de définir leurs profils d'interactions avec ces microtubules (Nislow et al., 1992). Cette étude a ainsi pu mettre en évidence un nouveau site de fixation de la tubuline dans la région C-terminale de MKLP-1 (domaine « queue »). Ce nouveau site d'interaction aux microtubules permet alors un ancrage de MKLP-1 sur ces deux domaines N et C terminaux, séparés *via* un domaine d'enroulement super-hélice.

Il est relaté que le « centralspindlin complex » nécessite à la fois MKLP-1 et MgcRacGAP pour sa localisation au sein du « corps intermédiaire », mais les expériences de co-précipitations indiquent que MgcRacGAP ne possède pas de site de fixation pour les microtubules. Au sein du « centralspindlin complex », MKLP-1 intervient donc seul dans le pontage des microtubules. Cependant, il faut noter que d'autres effecteurs sont recrutés lors de la formation du « corps intermédiaire », comme Cep55 et PRC1, deux protéines qui participent également au pontage des microtubules. Il est d'ailleurs intéressant de noter que Cep55 est capable de s'associer au « centralspindlin complex » *via* les régions « cous » et « tiges » de MKLP-1 (Zhao et al., 2006), tandis que PRC1 interagit avec la partenaire MgcRacGAP au niveau du domaine GAP (Ban et al., 2004). Le complexe MKLP-1/MgcRacGAP est donc capable de ponter les microtubules mais sert aussi de complexe d'échafaudage permettant de recruter plusieurs autres protéines intervenant dans la cohésion de cette zone dense en microtubules.

Les données obtenues *in vivo* sur la différenciation des axones en dendrites révèlent que MKLP-1 intervient également aux processus de pontage de microtubules antiparallèles, spécifiques aux podocytes et aux neurones (Kobayashi et al., 1998 ; Sharp et al., 1997). Il a

ainsi été montré que le pontage de microtubules induit par MKLP-1 au sein des dendrites nécessite à la fois le domaine moteur et le domaine « queue » de cette kinésine. La délétion de l'un de ces domaines compromet l'agencement de microtubules antiparallèles et la dégénérescence des dendrites (Xu et al., 2006). Cependant, il n'a pas été montré dans ces études, si MKLP-1 intervenait seul ou sous sa forme liée à MgcRacGAP pour l'établissement de ces pontages antiparallèles.

Les résultats obtenus par expériences de co-précipitations ont permis d'améliorer notre compréhension de l'association « centralspindlin complex »/microtubules. Par le biais de ses deux domaines N et C terminaux, la kinésine MKLP-1 pourrait compacter le « corps intermédiaire » en fixant les microtubules. Ce phénomène va être renforcé par le recrutement de Cep55 et PRC1 sur le complexe d'échafaudage MKLP-1/MgcRacGAP. Cet assemblage de plusieurs protéines liant la tubuline sur de multiples sites d'ancrages est alors à l'origine de l'apparition locale d'un agrégat dense et robuste (« corps intermédiaire »). À la lumière des résultats obtenus rendant compte de la reconnaissance bipolaire de MKLP-1 pour les microtubules, j'ai dressé un modèle schématisant le pontage des microtubules *via* le complexe MKLP-1/MgcRacGAP (**figure 45**).

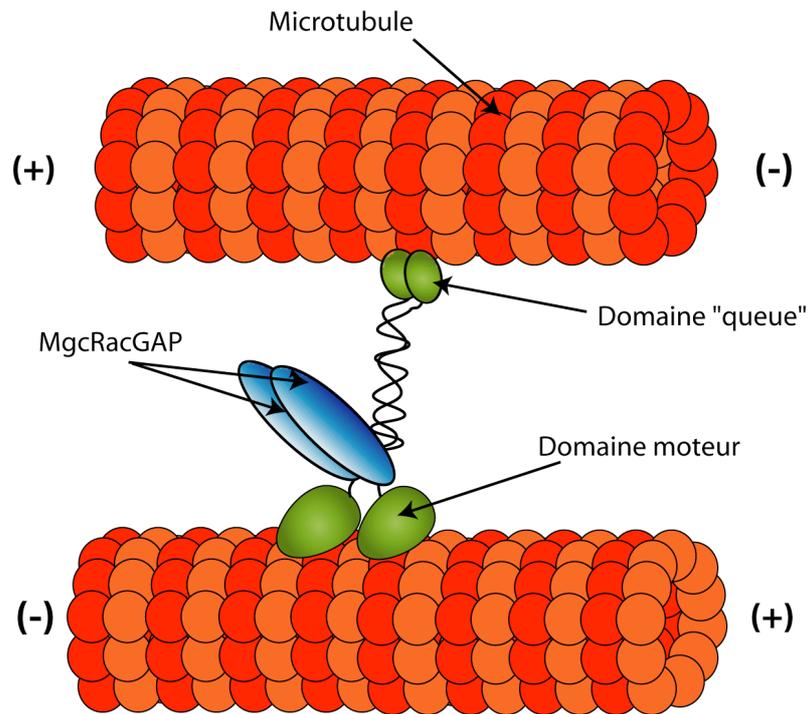


Figure 45 : Modèle du pontage de microtubules antiparallèles par le « centralspindlin complex ». La kinésine MKLP-1 est capable de fixer les microtubules sur chacune de ses extrémités N et C terminales *via* ses deux domaines moteurs et ses deux domaines « queues » capables d’interagir avec la tubuline.

References bibliographiques

- Adams, R. R., Tavares, A. A., Salzberg, A., Bellen, H. J., and Glover, D. M.** (1998). pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis. *Genes Dev* 12, 1483-1494.
- Aizawa, H., Sekine, Y., Takemura, R., Zhang, Z., Nangaku, M., and Hirokawa, N.** (1992). Kinesin family in murine central nervous system. *J Cell Biol* 119, 1287-1296.
- Alberts, A. S.** (2001). Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* 276, 2824-2830.
- Arnal, I., and Wade, R. H.** (1995). How does taxol stabilize microtubules? *Curr Biol* 5, 900-908.
- Asbury, C. L., Fehr, A. N., and Block, S. M.** (2003). Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism. *Science* 302, 2130-2134.
- Astumian, R. D., and Derenyi, I.** (1999). A chemically reversible Brownian motor: application to kinesin and Ncd. *Biophys J* 77, 993-1002.
- Ban, R., Irino, Y., Fukami, K., and Tanaka, H.** (2004). Human mitotic spindle-associated protein PRC1 inhibits MgcRacGAP activity toward Cdc42 during the metaphase. *J Biol Chem* 279, 16394-16402.
- Bement, W. M.** (2007). Cytokinetic pyrotechnics. *Dev Cell* 12, 663-664.
- Birkenfeld, J., Nalbant, P., Bohl, B. P., Pertz, O., Hahn, K. M., and Bokoch, G. M.** (2007). GEF-H1 modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. *Dev Cell* 12, 699-712.
- Block, S. M., Goldstein, L. S., and Schnapp, B. J.** (1990). Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* 348, 348-352.
- Bloom, G. S.** (2001). The UNC-104/KIF1 family of kinesins. *Curr Opin Cell Biol* 13, 36-40.
- Boman, A. L., Kuai, J., Zhu, X., Chen, J., Kuriyama, R., and Kahn, R. A.** (1999). Arf proteins bind to mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1) in a GTP-dependent fashion. *Cell Motil Cytoskeleton* 44, 119-132.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brier, S., Carletti, E., DeBonis, S., Hewat, E., Lemaire, D., and Kozielski, F.** (2006). The marine natural product adociasulfate-2 as a tool to identify the MT-binding region of kinesins. *Biochemistry* 45, 15644-15653.
- Carrier, M. F., and Pantaloni, D.** (1981). Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization. *Biochemistry* 20, 1918-1924.
- Case, R. B., Pierce, D. W., Hom-Booher, N., Hart, C. L., and Vale, R. D.** (1997). The directional preference of kinesin motors is specified by an element outside of the motor catalytic domain. *Cell* 90, 959-966.

- Coy, D. L., Hancock, W. O., Wagenbach, M., and Howard, J.** (1999a). Kinesin's « queue » domain is an inhibitory regulator of the motor domain. *Nat Cell Biol* 1, 288-292.
- Coy, D. L., Wagenbach, M., and Howard, J.** (1999b). Kinesin takes one 8-nm step for each ATP that it hydrolyzes. *J Biol Chem* 274, 3667-3671.
- Crevel, I. M., Lockhart, A., and Cross, R. A.** (1996). Weak and strong states of kinesin and ncd. *J Mol Biol* 257, 66-76.
- Crevel, I. M., Lockhart, A., and Cross, R. A.** (1997). Kinetic evidence for low chemical processivity in ncd and Eg5. *J Mol Biol* 273, 160-170.
- Daniels, M. J., Wang, Y., Lee, M., and Venkitaraman, A. R.** (2004). Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science* 306, 876-879.
- Deavours, B. E., and Walker, R. A.** (1999). Nuclear localization of C-terminal domains of the kinesin-like protein MKLP-1. *Biochem Biophys Res Commun* 260, 605-608.
- DeBonis, S., Simorre, J. P., Crevel, I., Lebeau, L., Skoufias, D. A., Blangy, A., Ebel, C., Gans, P., Cross, R., Hackney, D. D., et al.** (2003). Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5. *Biochemistry* 42, 338-349.
- Dechant, R., and Glotzer, M.** (2003). Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation. *Dev Cell* 4, 333-344.
- Delcros, J. G., Prigent, C., and Giet, R.** (2006). Dynactin targets Pavarotti-KLP to the central spindle during anaphase and facilitates cytokinesis in *Drosophila* S2 cells. *J Cell Sci* 119, 4431-4441.
- Dustin, P.** (1984). [15 years of progress in the biological sciences]. *Rev Med Brux* 5, 115-119.
- Endow, S. A.** (1999). Determinants of molecular motor directionality. *Nat Cell Biol* 1, E163-167.
- Endow, S. A., and Higuchi, H.** (2000). A mutant of the motor protein kinesin that moves in both directions on microtubules. *Nature* 406, 913-916.
- Ewald, A., Zunkler, C., Lourim, D., and Dabauvalle, M. C.** (2001). Microtubule-dependent assembly of the nuclear envelope in *Xenopus laevis* egg extract. *Eur J Cell Biol* 80, 678-691.
- Fan, J., and Beck, K. A.** (2004). A role for the spectrin superfamily member Syne-1 and kinesin II in cytokinesis. *J Cell Sci* 117, 619-629.
- Fan, J., Griffiths, A. D., Lockhart, A., Cross, R. A., and Amos, L. A.** (1996). Microtubule minus ends can be labelled with a phage display antibody specific to alpha-tubulin. *J Mol Biol* 259, 325-330.
- Field, C. M., and Alberts, B. M.** (1995). Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex. *J Cell Biol* 131, 165-178.
- Gilbert, S. L., Zhang, L., Forster, M. L., Anderson, J. R., Iwase, T., Soliven, B., Donahue, L. R., Sweet, H. O., Bronson, R. T., Davisson, M. T., et al.** (2006). Trak1 mutation disrupts GABA(A) receptor homeostasis in hypertonic mice. *Nat Genet* 38, 245-250.
- Gilbert, S. P., Moyer, M. L., and Johnson, K. A.** (1998). Alternating site mechanism of the kinesin ATPase. *Biochemistry* 37, 792-799.

- Glotzer, M.** (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307, 1735-1739.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Metoz, F.** (1999). ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15, 305-308.
- Gregory, S. L., Ebrahimi, S., Milverton, J., Jones, W. M., Bejsovec, A., and Saint, R.** (2008). Cell division requires a direct link between microtubule-bound RacGAP and Anillin in the contractile ring. *Curr Biol* 18, 25-29.
- Gromley, A., Yeaman, C., Rosa, J., Redick, S., Chen, C. T., Mirabelle, S., Guha, M., Sillibourne, J., and Doxsey, S. J.** (2005). Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell* 123, 75-87.
- Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E. A., and Barr, F. A.** (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *J Cell Biol* 166, 167-172.
- Gunawardena, S., and Goldstein, L. S.** (2004). Cargo-carrying motor vehicles on the neuronal highway: transport pathways and neurodegenerative disease. *J Neurobiol* 58, 258-271.
- Guo, S., and Kemphues, K. J.** (1996). A non-muscle myosin required for embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 382, 455-458.
- Guse, A., Mishima, M., and Glotzer, M.** (2005). Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol* 15, 778-786.
- Hackney, D. D.** (1988). Kinesin ATPase: rate-limiting ADP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6314-6318.
- Hackney, D. D., and Jiang, W.** (2001). Assays for kinesin microtubule-stimulated ATPase activity. *Methods Mol Biol* 164, 65-71.
- Hackney, D. D., Malik, A. S., and Wright, K. W.** (1989). Nucleotide-free kinesin hydrolyzes ATP with burst kinetics. *J Biol Chem* 264, 15943-15948.
- Hancock, W. O., and Howard, J.** (1998). Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J Cell Biol* 140, 1395-1405.
- Heald, R., and Nogales, E.** (2002). Microtubule dynamics. *J Cell Sci* 115, 3-4.
- Helenius, J., Brouhard, G., Kalaidzidis, Y., Diez, S., and Howard, J.** (2006). The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends. *Nature* 441, 115-119.
- Hirose, K., Akimaru, E., Akiba, T., Endow, S. A., and Amos, L. A.** (2006). Large conformational changes in a kinesin motor catalyzed by interaction with microtubules. *Mol Cell* 23, 913-923.
- Hirose, K., Kawashima, T., Iwamoto, I., Nosaka, T., and Kitamura, T.** (2001). MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody. *J Biol Chem* 276, 5821-5828.
- Hizlan, D., Mishima, M., Tittmann, P., Gross, H., Glotzer, M., and Hoenger, A.** (2006). Structural analysis of the ZEN-4/CeMKLP1 motor domain and its interaction with microtubules. *J Struct Biol* 153, 73-84.
- Hoenger, A., and Gross, H.** (2008). Structural investigations into microtubule-MAP complexes. *Methods Cell Biol* 84, 425-444.

- Holzinger, A., and Lutz-Meindl, U.** (2002). Kinesin-like proteins are involved in postmitotic nuclear migration of the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. *Cell Biol Int* 26, 689-697.
- Howard, J., Hudspeth, A. J., and Vale, R. D.** (1989). Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342, 154-158.
- Hurley, J. H., and Meyer, T.** (2001). Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr Opin Cell Biol* 13, 146-152.
- Hyman, A. A., Chretien, D., Arnal, I., and Wade, R. H.** (1995). Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate. *J Cell Biol* 128, 117-125.
- Hyman, A. A., and Karsenti, E.** (1996). Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* 84, 401-410.
- Inoue, Y. H., do Carmo Avides, M., Shiraki, M., Deak, P., Yamaguchi, M., Nishimoto, Y., Matsukage, A., and Glover, D. M.** (2000). Orbit, a novel microtubule-associated protein essential for mitosis in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 149, 153-166.
- Janosi, I. M., Chretien, D., and Flyvbjerg, H.** (2002). Structural microtubule cap: stability, catastrophe, rescue, and third state. *Biophys J* 83, 1317-1330.
- Jantsch-Plunger, V., Gonczy, P., Romano, A., Schnabel, H., Hamill, D., Schnabel, R., Hyman, A. A., and Glotzer, M.** (2000). CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis. *J Cell Biol* 149, 1391-1404.
- Jiang, S., Li, M., Xu, T., Ren, D., and Liu, G.** (2007). Two kinesins from *Arabidopsis*, KatB and KatC, have a second microtubule-binding site in the « queue » domain. *J Biochem Mol Biol* 40, 44-52.
- Jordan, P., and Karess, R.** (1997). Myosin light chain-activating phosphorylation sites are required for oogenesis in *Drosophila*. *J Cell Biol* 139, 1805-1819.
- Kamal, A., Almenar-Queralt, A., LeBlanc, J. F., Roberts, E. A., and Goldstein, L. S.** (2001). Kinesin-mediated axonal transport of a membrane compartment containing beta-secretase and presenilin-1 requires APP. *Nature* 414, 643-648.
- Karabay, A., and Walker, R. A.** (1999a). Identification of microtubule binding sites in the Ncd « queue » domain. *Biochemistry* 38, 1838-1849.
- Karabay, A., and Walker, R. A.** (1999b). The Ncd « queue » domain promotes microtubule assembly and stability. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 39-43.
- Karsenti, E., Kobayashi, S., Mitchison, T., and Kirschner, M.** (1984). Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. *J Cell Biol* 98, 1763-1776.
- Kashina, A. S., Baskin, R. J., Cole, D. G., Wedaman, K. P., Saxton, W. M., and Scholey, J. M.** (1996a). A bipolar kinesin. *Nature* 379, 270-272.
- Kashina, A. S., Scholey, J. M., Leszyk, J. D., and Saxton, W. M.** (1996b). An essential bipolar mitotic motor. *Nature* 384, 225.
- Katta, V., and Chait, B. T.** (1991). Conformational changes in proteins probed by hydrogen-exchange electrospray-ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 5, 214-217.

- Kikkawa, M., and Hirokawa, N.** (2006). High-resolution cryo-EM maps show the nucleotide binding pocket of KIF1A in open and closed conformations. *Embo J* 25, 4187-4194.
- Kim, A. J., and Endow, S. A.** (2000). A kinesin family tree. *J Cell Sci* 113 Pt 21, 3681-3682.
- Kim, H., Binder, L. I., and Rosenbaum, J. L. (1979). The periodic association of MAP2 with brain microtubules in vitro. *J Cell Biol* 80, 266-276.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., et al.** (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273, 245-248.
- Kobayashi, N., and Mundel, P.** (1998). A role of microtubules during the formation of cell processes in neuronal and non-neuronal cells. *Cell Tissue Res* 291, 163-174.
- Kobayashi, N., Reiser, J., Kriz, W., Kuriyama, R., and Mundel, P.** (1998). Nonuniform microtubular polarity established by CHO1/MKLP1 motor protein is necessary for process formation of podocytes. *J Cell Biol* 143, 1961-1970.
- Kull, FJ., Sablin, EP., Lau, R., Fletterick, RJ., and Vale, RD.** (1996). Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature* 380, 550-555
- Kurasawa, Y., Earnshaw, W. C., Mochizuki, Y., Dohmae, N., and Todokoro, K.** (2004). Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *Embo J* 23, 3237-3248.
- Lasek, R. J., and Brady, S. T.** (1985). Attachment of transported vesicles to microtubules in axoplasm is facilitated by AMP-PNP. *Nature* 316, 645-647.
- Lee, K. S., Yuan, Y. L., Kuriyama, R., and Erikson, R. L.** (1995). Plk is an M-phase-specific protein kinase and interacts with a kinesin-like protein, CHO1/MKLP-1. *Mol Cell Biol* 15, 7143-7151.
- Lewis, S. A., Wang, D. H., and Cowan, N. J.** (1988). Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science* 242, 936-939.
- Liao, H., Li, G., and Yen, T. J.** (1994). Mitotic regulation of microtubule cross-linking activity of CENP-E kinetochore protein. *Science* 265, 394-398.
- Lin, F., Hiesberger, T., Cordes, K., Sinclair, A. M., Goldstein, L. S., Somlo, S., and Igarashi, P.** (2003). Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5286-5291.
- Liu, X., Zhou, T., Kuriyama, R., and Erikson, R. L.** (2004). Molecular interactions of Polo-like-kinase 1 with the mitotic kinesin-like protein CHO1/MKLP-1. *J Cell Sci* 117, 3233-3246.
- Low, S. H., Li, X., Miura, M., Kudo, N., Quinones, B., and Weimbs, T.** (2003). Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells. *Dev Cell* 4, 753-759.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J.** (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252, 1162-1164.
- Maney, T., Wagenbach, M., and Wordeman, L.** (2001). Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin. *J Biol Chem* 276, 34753-34758.
- Matuliene, J., and Kuriyama, R.** (2002). Kinesin-like protein CHO1 is required for the formation of midbody matrix and the completion of cytokinesis in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 13, 1832-1845.

- Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L., and Mitchison, T. J.** (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* 286, 971-974.
- McDonnell, A. V., Jiang, T., Keating, A. E., and Berger, B.** (2006). Paircoil2: improved prediction of coiled coils from sequence. *Bioinformatics* 22, 356-358.
- Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y. C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W. S., Jr., et al.** (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell* 4, 549-560.
- Mishima, M., Kaitna, S., and Glotzer, M.** (2002). Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev Cell* 2, 41-54.
- Mishima, M., Pavicic, V., Gruneberg, U., Nigg, E. A., and Glotzer, M.** (2004). Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature* 430, 908-913.
- Mitchison, T. J.** (1993). Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* 261, 1044-1047.
- Miyamoto, D. T., Perlman, Z. E., Mitchison, T. J., and Shirasu-Hiza, M.** (2003). Dynamics of the mitotic spindle--potential therapeutic targets. *Prog Cell Cycle Res* 5, 349-360.
- Mollinari, C., Kleman, J. P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., and Margolis, R. L.** (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol* 157, 1175-1186.
- Neef, R., Klein, U. R., Kopajtich, R., and Barr, F. A.** (2006). Cooperation between mitotic kinesins controls the late stages of cytokinesis. *Curr Biol* 16, 301-307.
- Nishimura, Y., and Yonemura, S.** (2006). Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci* 119, 104-114.
- Nislow, C., Sellitto, C., Kuriyama, R., and McIntosh J. R.** (1990). A monoclonal antibody to a mitotic microtubule-associated protein blocks mitotic progression. *J Cell Biol* 111, 511-522
- Nislow, C., Lombillo, V. A., Kuriyama, R., and McIntosh, J. R.** (1992). A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules in vitro localizes to the interzone of mitotic spindles. *Nature* 359, 543-547.
- Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M., and Hirokawa, N.** (1998). Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell* 95, 829-837.
- Okada, Y., and Hirokawa, N.** (1999). A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A. *Science* 283, 1152-1157.
- Oki, M., Aihara, H., and Ito, T.** (2007). Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell Biochem* 41, 319-336.
- Pavicic-Kaltenbrunner, V., Mishima, M., and Glotzer, M.** (2007). Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex. *Mol Biol Cell* 18, 4992-5003.

- Perozzo, R., Folkers, G., and Scapozza, L.** (2004). Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J Recept Signal Transduct Res* 24, 1-52.
- Peskin, C. S., and Oster, G.** (1995). Coordinated hydrolysis explains the mechanical behavior of kinesin. *Biophys J* 68, 202S-210S ; discussion 210S-211S.
- Petronczki, M., Glotzer, M., Kraut, N., and Peters, J. M.** (2007). Polo-like kinase 1 triggers the initiation of cytokinesis in human cells by promoting recruitment of the RhoGEF Ect2 to the central spindle. *Dev Cell* 12, 713-725.
- Petronczki, M., Lenart, P., and Peters, J. M.** (2008). Polo on the Rise-from Mitotic Entry to Cytokinesis with Plk1. *Dev Cell* 14, 646-659.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C.** (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* 297, 612-615.
- Raemaekers, T., Ribbeck, K., Beaudouin, J., Annaert, W., Van Camp, M., Stockmans, I., Smets, N., Bouillon, R., Ellenberg, J., and Carmeliet, G.** (2003). NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *J Cell Biol* 162, 1017-1029.
- Reddie, K. G., Roberts, D. R., and Dore, T. M.** (2006). Inhibition of kinesin motor proteins by adociasulfate-2. *J Med Chem* 49, 4857-4860.
- Rietdorf, J., Ploubidou, A., Reckmann, I., Holmstrom, A., Frischknecht, F., Zettl, M., Zimmermann, T., and Way, M.** (2001). Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat Cell Biol* 3, 992-1000.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M. F.** (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* 119, 419-429.
- Rosenfeld, S. S., Renner, B., Correia, J. J., Mayo, M. S., and Cheung, H. C.** (1996). Equilibrium studies of kinesin-nucleotide intermediates. *J Biol Chem* 271, 9473-9482.
- Rosenthal, H. E.** (1967). A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system. *Anal Biochem* 20, 525-532.
- Sack, S., Kull, F. J., and Mandelkow, E.** (1999). Motor proteins of the kinesin family. Structures, variations, and nucleotide binding sites. *Eur J Biochem* 262, 1-11.
- Sakowicz, R., Berdelis, M. S., Ray, K., Blackburn, C. L., Hopmann, C., Faulkner, D. J., and Goldstein, L. S.** (1998). A marine natural product inhibitor of kinesin motors. *Science* 280, 292-295.
- Schief, W. R., and Howard, J.** (2001). Conformational changes during kinesin motility. *Curr Opin Cell Biol* 13, 19-28.
- Schliwa, M., and Woehlke, G.** (2003). Molecular motors. *Nature* 422, 759-765.
- Schumacher, J. M., Golden, A., and Donovan, P. J.** (1998). AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Cell Biol* 143, 1635-1646.
- Severson, A. F., Hamill, D. R., Carter, J. C., Schumacher, J., and Bowerman, B.** (2000). The aurora-related kinase AIR-2 recruits ZEN-4/CeMKLP1 to the mitotic spindle at metaphase and is required for cytokinesis. *Curr Biol* 10, 1162-1171.

- Sharp, D. J., Rogers, G. C., and Scholey, J. M.** (2000). Roles of motor proteins in building microtubule-based structures: a basic principle of cellular design. *Biochim Biophys Acta* 1496, 128-141.
- Sharp, D. J., Yu, W., Ferhat, L., Kuriyama, R., Rueger, D. C., and Baas, P. W.** (1997). Identification of a microtubule-associated motor protein essential for dendritic differentiation. *J Cell Biol* 138, 833-843.
- Shiroguchi, K., Ohsugi, M., Edamatsu, M., Yamamoto, T., and Toyoshima, Y. Y.** (2003). The second microtubule-binding site of monomeric kid enhances the microtubule affinity. *J Biol Chem* 278, 22460-22465.
- Stenlund, P., Frostell-Karlsson, A., and Karlsson, O. P.** (2006). Studies of small molecule interactions with protein phosphatases using biosensor technology. *Anal Biochem* 353, 217-225.
- Stewart, R. J., Semerjian, J., and Schmidt, C. F.** (1998). Highly processive motility is not a general feature of the kinesins. *Eur Biophys J* 27, 353-360.
- Straight, A. F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N. J., Sellers, J. R., and Mitchison, T. J.** (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* 299, 1743-1747.
- Studier, F. W., and Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-130.
- Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I., and Miki, T.** (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol* 147, 921-928.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- Tilney, L. G., Bryan, J., Bush, D. J., Fujiwara, K., Mooseker, M. S., Murphy, D. B., and Snyder, D. H.** (1973). Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol* 59, 267-275.
- Toure, A., Dorseuil, O., Morin, L., Timmons, P., Jegou, B., Reibel, L., and Gacon, G.** (1998). MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to *Drosophila* rotundRacGAP gene product, is expressed in male germ cells. *J Biol Chem* 273, 6019-6023.
- Toure, A., Morin, L., Pineau, C., Becq, F., Dorseuil, O., and Gacon, G.** (2001). Tat1, a novel sulfate transporter specifically expressed in human male germ cells and potentially linked to rhoGTPase signaling. *J Biol Chem* 276, 20309-20315.
- Toure, A., Mzali, R., Liot, C., Seguin, L., Morin, L., Crouin, C., Chen-Yang, I., Tsay, Y. G., Dorseuil, O., Gacon, G., and Bertoglio, J.** (2008). Phosphoregulation of MgcRacGAP in mitosis involves Aurora B and Cdk1 protein kinases and the PP2A phosphatase. *FEBS Lett* 582, 1182-1188.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., and Arakawa, T.** (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expr Purif* 28, 1-8.
- Vale, R. D., Case, R., Sablin, E., Hart, C., and Fletterick, R.** (2000). Searching for kinesin's mechanical amplifier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355, 449-457.

- Vale, R. D., and Milligan, R. A.** (2000). The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* 288, 88-95.
- Vale, R. D., Reese, T. S., and Sheetz, M. P.** (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39-50.
- Velappan, N., Sblattero, D., Chasteen, L., Pavlik, P., and Bradbury, A. R. M.** (2007) Plasmid incompatibility : more compatible than previously thought ? *Protein Eng. Des. Sel.* 20, 309-313.
- Verbrugghe, K. J., and White, J. G.** (2004). SPD-1 is required for the formation of the spindle midzone but is not essential for the completion of cytokinesis in *C. elegans* embryos. *Curr Biol* 14, 1755-1760.
- Verni, F., Somma, M. P., Gunsalus, K. C., Bonaccorsi, S., Belloni, G., Goldberg, M. L., and Gatti, M.** (2004). Feo, the *Drosophila* homolog of PRC1, is required for central-spindle formation and cytokinesis. *Curr Biol* 14, 1569-1575.
- Wade, R. H., and Kozielski, F.** (2000). Structural links to kinesin directionality and movement. *Nat Struct Biol* 7, 456-460.
- Werner, M., Munro, E., and Glotzer, M.** (2007). Astral signals spatially bias cortical myosin recruitment to break symmetry and promote cytokinesis. *Curr Biol* 17, 1286-1297.
- Wood, K. W., Cornwell, W. D., and Jackson, J. R.** (2001). Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr Opin Pharmacol* 1, 370-377.
- Wright, B. D., Terasaki, M., and Scholey, J. M.** (1993). Roles of kinesin and kinesin-like proteins in sea urchin embryonic cell division: evaluation using antibody microinjection. *J Cell Biol* 123, 681-689.
- Xu, X., He, C., Zhang, Z., and Chen, Y.** (2006). MKLP1 requires specific domains for its dendritic targeting. *J Cell Sci* 119, 452-458.
- Yang, J. T., Laymon, R. A., and Goldstein, L. S.** (1989). A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell* 56, 879-889.
- Yu, W., Cook, C., Sauter, C., Kuriyama, R., Kaplan, P. L., and Baas, P. W.** (2000). Depletion of a microtubule-associated motor protein induces the loss of dendritic identity. *J Neurosci* 20, 5782-5791.
- Yu, W., Sharp, D. J., Kuriyama, R., Mallik, P., and Baas, P. W.** (1997). Inhibition of a mitotic motor compromises the formation of dendrite-like processes from neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 136, 659-668.
- Yuce, O., Piekny, A., and Glotzer, M.** (2005). An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol* 170, 571-582.
- Zhang, J. H., Chung, T. D., and Oldenburg, K. R.** (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 4, 67-73.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H. W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., et al.** (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105, 587-597.
- Zhao, W. M., and Fang, G.** (2005). MgcRacGAP controls the assembly of the contractile ring and the initiation of cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13158-13163.

Zhao, W. M., Seki, A., and Fang, G. (2006). Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. *Mol Biol Cell* *17*, 3881-3896.

Zhu, C., Bossy-Wetzel, E., and Jiang, W. (2005a). Recruitment of MKLP1 to the spindle midzone/midbody by INCENP is essential for midbody formation and completion of cytokinesis in human cells. *Biochem J* *389*, 373-381.

Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Levenson, J. D., Bossy-Wetzel, E., Fan, J. B., Abraham, R. T., and Jiang, W. (2005b). Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Mol Biol Cell* *16*, 3187-3199.

- RÉSUMÉ -

Les kinésines constituent une famille protéique convertissant l'énergie d'hydrolyse de l'ATP en un travail mécanique permettant un déplacement de l'enzyme le long des microtubules. Chez l'homme, une quarantaine de kinésines sont actuellement recensées et 13 d'entre elles sont nommées kinésines mitotiques en raison de leurs implications essentielles au bon déroulement de la Mitose. La protéine MKLP-1, kinésine de la sous-famille 6, est l'une de ces kinésines mitotiques. *In vivo*, elle s'associe à la protéine MgcRacGAP (protéine activatrice de petites protéines G) pour former un complexe hétérotétramérique : le « centralspindlin complex ». Ce complexe est un élément important de la régulation de la cytokinèse et participe notamment à la formation du « corps intermédiaire » durant la division cellulaire. MKLP-1 possède à la différence des autres kinésines, une large insertion de 80 acides aminés dans la boucle L6 de son domaine moteur ; cette insertion est une caractéristique unique des kinésines de la sous-famille 6 (MKLP-2, MPP1...). Afin de sonder le rôle de la boucle L6 au cours des processus catalytiques, j'ai effectué la caractérisation enzymatique du domaine moteur sauvage de MKLP1 et d'un mutant où la boucle native L6 est remplacée par la boucle L6 de la kinésine conventionnelle KHC (5 acides aminés). J'ai aussi réalisé un criblage de chimiothèques sur l'activité ATPasique du domaine moteur. J'ai ainsi pu mettre en évidence un nouvel inhibiteur de la reconnaissance kinésine/tubuline. De plus, pour éclaircir les mécanismes mis en jeu par le « centralspindlin complex » dans l'agrégation des microtubules, j'ai entrepris pour différentes constructions de MKLP-1 et de MgcRacGAP, l'étude de leurs profils d'interactions avec la tubuline. J'ai ainsi pu établir un modèle de fixation du « centralspindlin complex » avec les microtubules.

- ABSTRACT -

Kinesins form a family of proteins that convert the energy from ATP hydrolysis to mechanical force for displacement of their cargoes along microtubules tracts. In Humans there are 40 kinesins, 13 of which are essentials for mitosis. MKLP-1 is a mitotic kinesin belonging to kinesin sub-family 6, which is essential for cytokinesis. In cells, MKLP-1 together with MgcRacGAP (a GTPase activating protein) contributes to the formation of the centralspindlin heterotetrameric complex. This MKLP-1/MgcRacGAP complex is an important regulatory component which participates to the formation of the midbody matrix during cell cleavage. MKLP1 has in its motor domain a large insert of 80 amino acid in the loop 6 compared to the other kinesins ; this longer loop 6 is an characteristic of the kinesin sub-family 6 (MPP1, MKLP-2...). To probe the role of the MKLP1 loop 6 in the mechanochemical cycle, I compared the MKLP1 ATPase activity of wild type with that a mutant in which the native Loop 6 (80 residues) was replaced by the conventionnal loop 6 of Kinesin heavy Chain (5 residues). In addition, I screen four librairies of small molecules in order to identify ATPase inhibitors of the MKLP-1 motor domain. This screen contributed to the identification of a non-specific MKLP-1 inhibitor that prevent the kinesin/tubulin association. Furthermore, in order to understand the microtubules-bundling activity of the centralspindlin complex, I studied the microtubule interaction pattern for differents MKLP-1 and MgcRacGAP constructs. The results allowed me to purpose an putative interaction model.