



Thèse présentée par

**Romain LOURY**

Pour obtenir le grade de

Docteur en Sciences de l'Université Louis Pasteur (Strasbourg I)

Discipline □ Sciences du Vivant

Spécialité □ Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Régulation de la phosphorylation mitotique  
de l'histone H3  
par la kinase Aurora-B**

Soutenue publiquement le 21 novembre 2003

Jury de thèse □

Directeur de thèse □	Dr. Paolo SASSONE-CORSI, IGBMC, Illkirch
Rapporteur interne □	Dr. Jean-Marc ÉGLY, IGBMC, Illkirch
Rapporteurs externes □	Dr. Michael HALL, BIOZENTRUM, Bâle Dr. Angel NEBREDA, EMBL, Heidelberg
Examineur □	Pr. Claude KEDINGER, ESBS, Illkirch

## **Remerciements**

Je tiens à remercier les membres du jury, Jean-Marc Égly, Michael Hall, Angel Nebreda et Claude Kedinger d'avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie Paolo de m'avoir accueilli dans son équipe, pour son soutien et les conseils qu'il m'a prodigués, ainsi que pour sa patience et son humour.

Je remercie tous les membres de l'équipe, passés et présents, et tout particulièrement Gian-Maria Fimia et Lucia Monaco pour le travail effectué en commun. Je remercie également Estelle Heitz, Maryam Rastegar, Stéphanie Roux pour leur aide technique et leur sourire. Également un grand merci à toutes les personnes de la pièce 3016, Giulia Fienga, Enzo Lalli et Sylvia Lehmann, qui ont su, avec beaucoup de stoïcisme, supporter pendant ces 4 années mes tours de chant, souvent bruyants et approximatifs. Et bien sûr un grand merci à Claudia Crosio, dont la haute valeur humaine ne sut trouver d'égal que dans une honnêteté intellectuelle d'exception, deux qualités dont elle me fit généreusement profiter durant nos trois années de collaboration.

Je remercie également nos collaborateurs, David Allis, Subrata Sen, Gilbert et Josiane de Murcia.

Je remercie tous les services communs de l'institut, et tout particulièrement le service de culture cellulaire, le service de synthèse des oligos, le service de séquençage et le service informatique. Merci à Doris, Hélène et en particulier à Maïté pour leur sourire et leur disponibilité.

Je remercie infiniment mes amis Alexis, Bertrand, Guillaume pour la relecture critique de ce manuscrit, mais également pour les nombreuses soirées arrosées passées en leur compagnie.

Enfin, merci à toutes les autres personnes de l'institut qui ont, grâce à leurs conseils, contribué à l'avancement de mes travaux de thèse.

Merci à ma famille, tout particulièrement Nora, Rémy, Pierre-Louis, Mary et Chantal, ainsi qu'aux éternels lycéens Greg, JS, Seb, Rems, Gizmo et Plasmo.

à Pauline et Pierre

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	4
<b>PROLOGUE</b> .....	7
<b>INTRODUCTION</b> .....	8
<b>I. LA CHROMATINE</b> .....	8
<i>A. Structure et composition de la chromatine</i> .....	8
<i>B. Les modifications des extrémités N-terminales des histones</i> .....	10
1) Acétylation.....	11
2) Méthylation.....	12
3) Phosphorylation.....	13
a) La transcription stimulus-dépendante.....	14
b) La réparation de l'ADN.....	15
c) L'apoptose.....	16
<i>C. Les combinaisons de modifications □ potentiels mécanismes d'action</i> .....	17
1) L'interdépendance des modifications d'histones.....	17
a) Cas d'influence positive.....	17
b) Cas d'influence négative.....	19
c) Cas de régulation trans-histones.....	19
2) Les mécanismes moléculaires.....	20
a) L'hypothèse «□ électrostatique□».....	20
b) L'hypothèse du «□ code histone□».....	21
<b>II. LA CONDENSATION MITOTIQUE DE L'ADN</b> .....	23
<i>A. Les facteurs protéiques dans la condensation</i> .....	24
1) La machinerie transcriptionnelle et les facteurs de transcription.....	24
2) Les acteurs de la dynamique mitotique de l'ADN.....	24
a) Les complexes à protéines SMC.....	24
i- Le complexe condensine.....	25
ii- Le complexe cohésine.....	26
b) La topoisomérase II□.....	27
<i>B. Les queues d'histones dans la condensation</i> .....	28
1) Des acteurs essentiels à la condensation.....	28

2) La phosphorylation mitotique des histones.....	28
a) La phosphorylation de l’histone H1.....	29
b) La phosphorylation de la sérine 10 de l’histone H3.....	29
i- Corrélacion spatio-temporelle avec la condensation des chromosomes.....	29
ii- Fonction de la phosphorylation de l’histone H3 sur la sérine 10.....	30
- Hypothèse de la condensation.....	30
- Rôle dans la cohésion interchromatides chez les plantes.....	31
- Hypothèse du «ready production label».....	33
c) La phosphorylation d’autres résidus d’histones.....	33
<b>III. LA FAMILLE DES KINASES MITOTIQUES AURORA.....</b>	<b>35</b>
<i>A. Caractéristiques générales des kinases Aurora.....</i>	<i>35</i>
1) Les kinases Aurora au cours de l’évolution.....	35
2) Structure primaire des kinases Aurora.....	36
3) Profil d’expression des kinases Aurora.....	37
4) Régulation de l’activité des kinases Aurora.....	37
<i>B. Aurora-A.....</i>	<i>39</i>
1) Fonction d’Aur-A dans le cycle du centrosome.....	39
2) Régulation par Aur-A de la dynamique du fuseau mitotique.....	41
<i>C. Aurora-B.....</i>	<i>41</i>
1) Rôle d’Aur-B dans l’orientation des kinétochores.....	43
2) Rôle d’Aur-B dans la cytokinèse.....	45
3) Les protéines passagères.....	45
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>48</b>
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>58</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>71</b>
<i>A. Analyse et discussion des résultats.....</i>	<i>71</i>
<i>B. D’autres kinases mitotiques pour l’histone H3? .....</i>	<i>72</i>
1) La kinase Aur-A chez <i>X. laevis</i> .....	73
2) La kinase PAK-1 chez <i>H. sapiens</i> .....	73
3) La kinase NIMA chez <i>A. nidulans</i> .....	74

---

<i>C. Rôle de la kinase Aurora-B dans la condensation</i> .....	75
1) Aur-B et les modifications mitotiques de la chromatine.....	75
2) Aur-B et les facteurs protéiques impliqués dans la condensation.....	76
a) Aur-B et le complexe condensine.....	76
b) Aur-B et le complexe cohésine.....	76
c) Aur-B et la topoisomérase II.....	77
3) Quels sont les mécanismes de régulation d'Aur-B.....	77
<i>D. Le rôle de la phosphorylation mitotique de l'histone H3</i> .....	79
1) Un rôle effecteur.....	79
2) Un rôle signalisateur.....	80
<i>E. Les modifications mitotiques de la chromatine</i> .....	81
1) L'hyperphosphorylation mitotique de l'histone H1.....	82
2) D'autres modifications mitotiques de la chromatine.....	83
3) Les combinaisons mitotiques de modifications d'histones.....	83
<b>ANNEXE I</b> .....	86
<b>ANNEXE II</b> .....	87
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	90

## **PROLOGUE**

L'ADN constitue le support universel de l'information génétique. Tandis que chez les organismes procaryotes et leurs dérivés symbiotiques (mitochondries et chloroplastes), il n'est pas compartimenté dans un organite spécifique, chez les cellules eucaryotes l'ADN génomique est contenu dans le noyau. Chez ces organismes, l'ADN atteint une telle taille (3 milliards de paires de bases pour le génome humain, équivalant à une longueur de 2 mètres) qu'il nécessite d'être compacté. C'est ainsi que ces cellules ont développé le système chromatinien, qui confère à l'ADN un très haut degré de compaction.

Ainsi, pendant longtemps, la chromatine n'a été considérée que comme une nécessité structurale imposée par un accroissement de la complexité, et donc de la longueur, du génome. Or, de nombreuses études menées ces dernières années tendent à démontrer que la chromatine n'est pas une structure inerte, un simple système d'empaquetage de l'ADN. Grâce aux nombreuses modifications post-traductionnelles des histones, ses composants protéiques majeurs, elle joue un rôle de premier plan dans la régulation de nombreux processus cellulaires impliquant des changements de compaction de l'ADN.

La condensation mitotique des chromosomes, nécessaire à la transmission du génome aux deux cellules-filles, est associée à des modifications d'histones, parmi lesquelles une phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3. Cependant, l'identité des enzymes responsables de ces modifications mitotiques demeure encore assez obscure. L'implication de nombreuses kinases mitotiques, dont la famille des kinases Aurora, dans la dynamique de l'ADN en mitose, laisse toutefois entrevoir pour ces régulateurs un rôle majeur dans l'établissement de ces modifications.

Afin d'introduire les résultats obtenus lors de mon travail de thèse, nous passerons en revue dans un premier temps les caractéristiques de la chromatine, notamment du point de vue des modifications d'histones et de leur combinaison, ainsi que de leur couplage avec plusieurs processus cellulaires.

La deuxième partie sera consacrée à l'étude de la condensation des chromosomes, ainsi qu'à sa régulation par divers facteurs protéiques et modifications d'histones, en particulier la phosphorylation de l'histone H3 sur la sérine 10.

Nous nous pencherons ensuite sur le rôle des kinases Aurora dans la dynamique chromatinienne, ainsi sur leurs caractéristiques structurales, leur expression spatio-temporelle et la régulation de leur activité.

## I. LA CHROMATINE

La chromatine est un assemblage nucléoprotéique composé d'ADN et de protéines histones. Dans tout organisme eucaryote, on observe 5 classes majeures de protéines histones : H2A, H2B, H3, H4 (les histones nucléosomales) et l'histone H1 (histone « linker ») (Felsenfeld et Groudine, 2003).

### A. Structure et composition de la chromatine

Les histones nucléosomales, ou histones du « core », sont de petites protéines basiques, extrêmement conservées d'un point de vue évolutif. Tandis que chez les eucaryotes unicellulaires, chaque type d'histone est codé par un gène unique, le nombre de gènes croît avec le degré d'évolution, favorisant ainsi l'apparition de nombreuses isoformes (Thatcher et Gorovsky, 1994). Bien que peu variables en taille et en séquence (Baxevanis et Landsman, 1996), certaines d'entre elles présentent des caractéristiques d'expression différentes, illustrées par des spécificités de tissu, d'expression lors du cycle cellulaire, mais également dans la fonction de la protéine produite. C'est ainsi le cas de l'histone H2AX, impliquée dans la réparation du génome et dont l'inactivation du gène entraîne une instabilité génomique (Rogakou *et al.*, 1998; Celeste *et al.*, 2002).



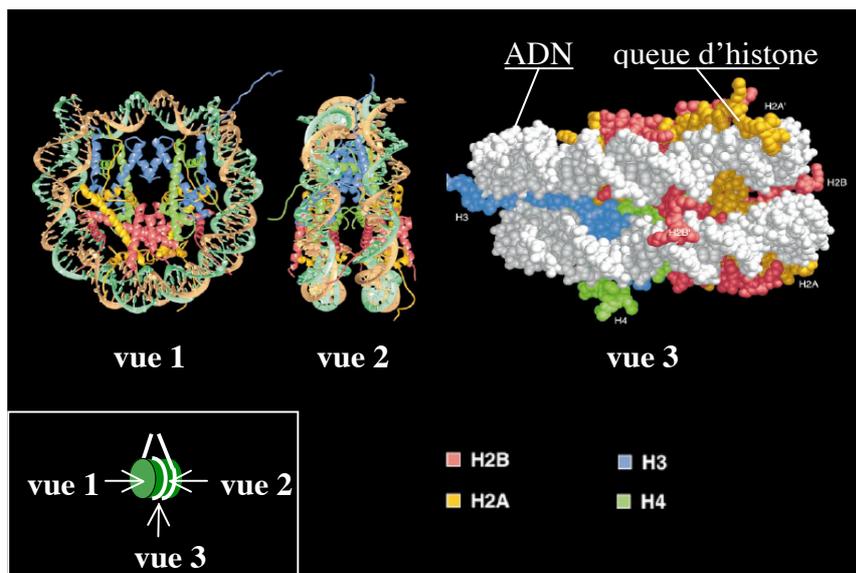
<b>H3</b>	136 aa	15 kDa	<sup>1</sup> ART <b>K</b> QTARKSTGG <b>K</b> AP <b>R</b> KQLAT <b>K</b> A <b>R</b> K <b>S</b> AP <sup>30</sup> ...
<b>H2A</b>	130 aa	14.3 kDa	<sup>1</sup> SG <b>R</b> G <b>K</b> QGG <b>K</b> AR <b>A</b> K <b>A</b> K <b>T</b> R <b>S</b> S <b>R</b> AGL <sup>23</sup> ...
<b>H2B</b>	126 aa	13.9 kDa	<sup>1</sup> PE <b>P</b> S <b>K</b> SAP <b>A</b> P <b>K</b> K <b>G</b> S <b>K</b> K <b>A</b> I <b>T</b> K <b>A</b> Q <b>K</b> K <b>D</b> G <b>K</b> K <b>R</b> K <b>R</b> S <b>R</b> K <sup>34</sup> ...
<b>H4</b>	103 aa	11.3 kDa	<sup>1</sup> SG <b>R</b> G <b>K</b> GG <b>K</b> GLG <b>K</b> GG <b>A</b> K <b>R</b> H <b>R</b> K <b>V</b> L <b>R</b> <sup>23</sup> ...

**Fig. 1: Structure primaire des histones nucléosomales.** Les queues N-terminales des histones sont riches en résidus basiques (marqués en rouge).

Dans un ordre croissant de taille, les histones du « core » H4, H2B, H2A et H3 comportent entre 100 et 140 acides aminés, équivalant à des poids moléculaires compris entre 11 et 15 kDa (fig. 1). Elles sont constituées d'un domaine C-terminal de structure globulaire,

et d'un domaine N-terminal constituant environ 20% du poids moléculaire de la protéine, très riche en résidus arginines et lysines qui leur confèrent leur caractère basique.

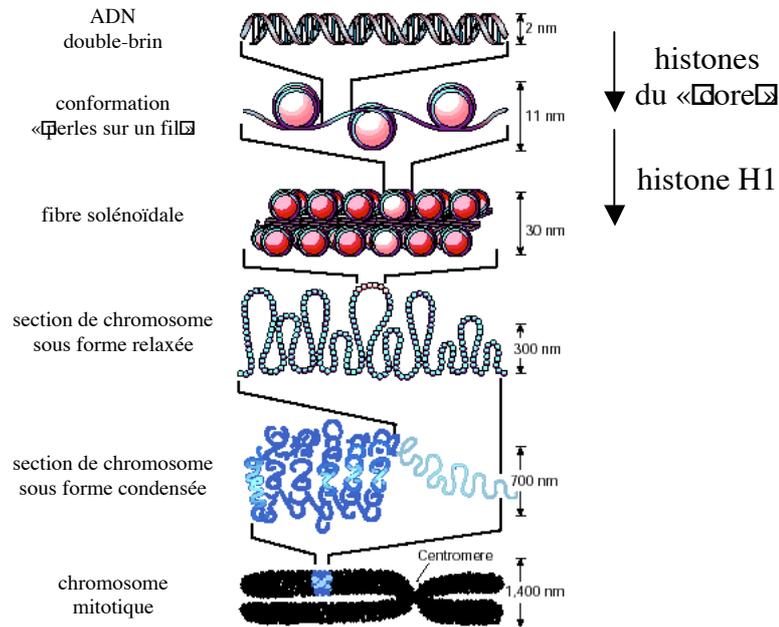
L'unité de base de la chromatine est le nucléosome. D'un poids moléculaire de 206 kDa, constitué de 146 paires de bases d'ADN enroulées en 1.65 tours autour de la partie protéique («nucléosome core»), il présente une structure discoïdale formée par les domaines C-terminaux de deux dimères H2A-H2B et d'un tetramère H3-H4 (fig. 2) (Luger *et al.*, 1997). Tandis que la partie centrale du nucléosome adopte une conformation stable, les extrémités N-terminales des histones présentent une plus grande flexibilité structurale. Elles n'interagissent pas avec la partie centrale du nucléosome, à la surface duquel elles émergent. De plus, la stabilité du nucléosome *in vitro* n'est pas perturbée de manière significative par leur absence (Ausio *et al.*, 1989). D'autres travaux ont cependant mis en évidence l'existence de contacts physiques entre les queues des histones H3 et H4 et l'ADN nucléosomal (Banères *et al.*, 1997).



**Fig. 2: Structure du nucléosome.** (d'après Luger *et al.*, 1997)

L'histone H1, dont les différentes isoformes présentent une variabilité de séquence et de taille supérieure à celle observée pour les autres histones, est une protéine avoisinant les 220 acides aminés, d'un poids moléculaire de 24.2 kDa. Grâce à ses propriétés de pontage

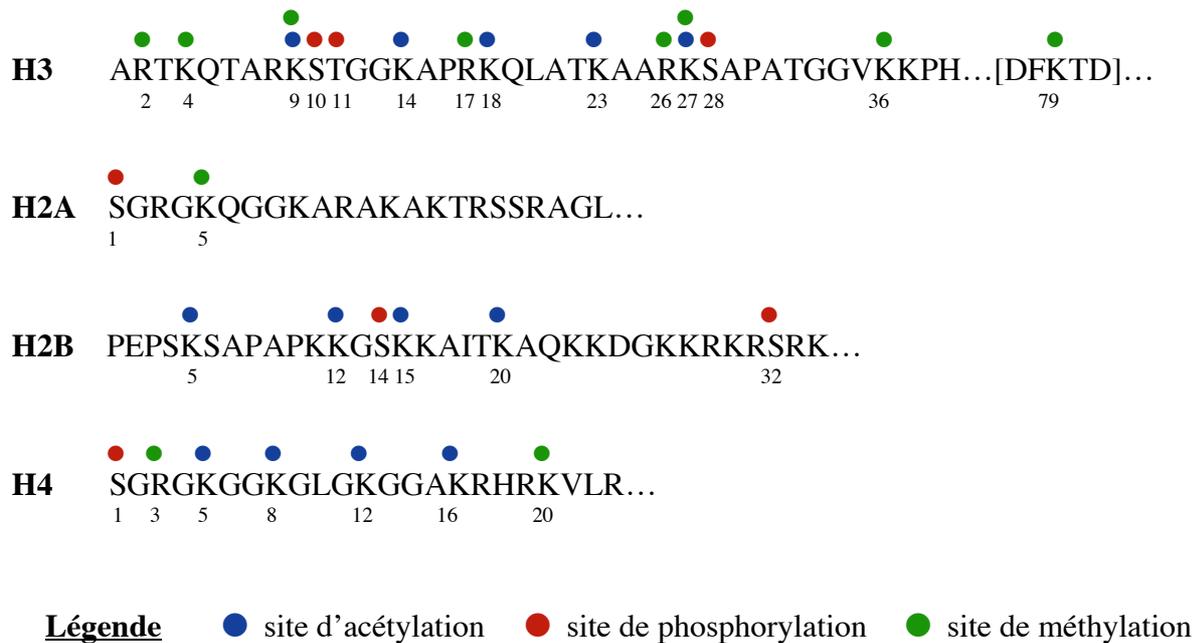
inter-nucléosomal, elle est impliquée dans la condensation de degré supérieur de l'ADN (fig. 3).



**Fig. 3: Les différents degrés d'organisation de la chromatine.** (d'après Felsenfeld et Groudine, 2003)

### **B. Les modifications des extrémités N-terminales des histones**

La plupart des travaux relatifs au rôle de la chromatine ont essentiellement porté sur les extrémités N-terminales des histones, cruciales à la régulation de l'état de compaction de la chromatine (Cheung *et al.*, 2000a). En effet, il est connu depuis longtemps que de nombreux résidus de ces queues sont soumis à diverses modifications post-traductionnelles, telles que, citées dans l'ordre de découverte, l'acétylation (résidus lysines) (Gregory *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2001), la phosphorylation (sérines et thréonines) (Gurley *et al.*, 1973; Mahadevan *et al.*, 1991), la méthylation (lysines et arginines) (Bannister *et al.*, 2002), mais également l'ubiquitination (Sun et Allis, 2002) et l'ADP-ribosylation (fig. 4) (Huletsky *et al.*, 1985).



**Fig. 4: Modifications connues des extrémités N-terminales des histones nucléosomales.**

Mon travail de thèse ayant essentiellement porté sur la phosphorylation de l'histone H3 lors de la mitose, il me semble d'un intérêt primordial de replacer cette modification dans un contexte global des modifications de la chromatine.

### 1) Acétylation

L'acétylation des histones, une réaction qui consiste au transfert d'un groupement acétyl (CH<sub>3</sub>-CO-) à partir d'une molécule d'acétyl-coenzyme A vers le groupement  $\alpha$ -aminé d'un résidu lysine, est catalysée par la classe d'enzymes des histone-acétyltransférases (HATs) (Roth *et al.*, 2001).

La corrélation entre statut d'acétylation des histones et activité transcriptionnelle, établie depuis bientôt 40 ans, a constitué le premier indice d'une relation directe entre les modifications de la chromatine et les processus liés à l'ADN (Allfrey *et al.*, 1964). En effet, les domaines euchromatiques transcriptionnellement actifs sont hyperacétylés (Hebbes *et al.*, 1988) tandis que les domaines inactifs hétérochromatiques sont hypoacétylés (Johnson *et al.*, 1998). De plus, l'acétylation des histones favorise l'accès des facteurs de transcription à leurs séquences-cibles (Lee *et al.*, 1993) et stimule la transcription (Nightingale *et al.*, 1998). Cette

fonction de régulation de la transcription est assurée par la classe des HATs de type A, dont la localisation est nucléaire. Parmi celles-ci, les plus étudiées sont Gcn5 de *S. cerevisiae* (Kuo *et al.*, 1996), d'abord identifiée comme coactivateur transcriptionnel (Grant *et al.*, 1998), ainsi que p300/CBP (Bannister et Kouzarides, 1996) et PCAF (Yang *et al.*, 1996) chez les Mammifères. De nombreux régulateurs transcriptionnels possèdent un domaine de fixation aux résidus lysine acétylés, le bromodomaine (Winston et Allis, 1999): l'acétylation permettrait ainsi de recruter directement ces régulateurs sur le gène à activer.

Il existe également une classe de HATs cytoplasmiques, regroupées sous l'appellation de HATs de type B, dont la fonction est d'acétyler les histones H3 et H4 néo-synthétisées. H3 et H4, associées en complexe trimérique avec le facteur CAF-1, sont alors transportées vers le noyau, puis déposées, lors de la phase S, sur l'ADN en cours de réplication (Mello et Almouzni, 2001).

## **2) Méthylation**

La méthylation des histones consiste en une réaction de transfert d'un groupement méthyle, apporté par une molécule de S-adenosine-méthionine (SAM), vers un résidu lysine ou arginine. Ces réactions sont catalysées par les histone-méthyltransférases (HMTs).

À la différence des phénomènes d'acétylation, essentiellement liés aux processus d'activation transcriptionnelle, la méthylation des histones est impliquée dans un spectre de processus cellulaires plus large, comme la formation et la maintenance de l'hétérochromatine ainsi que la régulation transcriptionnelle (Lachner et Jenuwein, 2002).

La méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, catalysée par la HMT Su(var)h39, constitue un marqueur de l'hétérochromatine constitutive, région du génome ne contenant pas de séquences codantes et présentant un haut degré de condensation (Rea *et al.*, 2000). Ces travaux ont permis d'attribuer une activité méthyltransférase au domaine SET, de fonction jusqu'alors inconnue, présent chez Su(var)h39 et d'autres HMTs. Après l'étape de méthylation, les protéines HP-1, famille protéique impliquée dans l'hétérochromatinisation et la répression transcriptionnelle (Singh et Georgatos, 2002), favoriseraient dans ces régions la formation d'hétérochromatine par interaction spécifique entre leur chromodomaine et le résidu lysine 9 méthylé (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001).

D'un point de vue transcriptionnel, la méthylation des résidus lysine peut avoir deux effets opposés, activateur ou répresseur, déterminés par la position du résidu affecté. Ainsi, la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, en plus de son rôle de marqueur

hétérochromatique, intervient également dans la répression par la protéine pRb de gènes situés dans les domaines euchromatiques. Il semblerait que ce mécanisme soit une fois de plus sous la dépendance du tandem Su(var)h39 et HP-1, directement recrutés par pRb sur les promoteurs d'intérêt (Nielsen *et al.*, 2001).

À l'opposé, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, catalysée par la HMT Set-1 chez *S. cerevisiae* (Briggs *et al.*, 2001), et par Set-9 chez l'Homme (Nishioka *et al.*, 2002) est restreinte à l'euchromatine, et semble liée à une activation transcriptionnelle (Strahl *et al.*, 1999; Bernstein *et al.*, 2002; Nishioka *et al.*, 2002). Il semblerait que cet évènement de méthylation déstabilise l'interaction entre un répresseur transcriptionnel, le facteur de désacétylation NuRD, et la queue de l'histone H3 (Nishioka *et al.*, 2002). Cependant, d'après d'autres travaux, la méthylation de la lysine 4 semble également être nécessaire à l'inhibition de certains loci, tels que les télomères et les loci portant les gènes codant pour l'ARN ribosomal (rDNA) (Briggs *et al.*, 2001). Cette dualité d'effets n'est pas encore très claire, et il est possible que l'effet activateur ou répresseur de cet évènement de méthylation dépende également de la présence d'autres modifications.

Il existe trois degrés distincts de méthylation d'un résidu lysine: la mono-, la di- et la triméthylation. Par la génération d'anticorps permettant la discrimination entre les formes di- et triméthylée de la lysine 4 de l'histone H3, il a récemment été mis à jour une spécificité fonctionnelle de ces degrés de modification: tandis que la tri-méthylation n'est présente que sur les gènes actifs, la di-méthylation (également présente exclusivement dans les régions euchromatiques) est présente indifféremment sur les gènes actifs et inactifs. D'après les auteurs de ces travaux, le degré de méthylation du résidu lysine 4 pourrait constituer un indicateur du degré de transcription (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Ainsi, il semble que le degré de modification d'un résidu revête également une certaine importance dans le langage des modifications d'histones.

### **3) Phosphorylation**

La phosphorylation, catalysée par les histone-kinases (HKs), consiste en une réaction de transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP vers un résidu sérine ou thréonine. Aucun phénomène de phosphorylation de résidus tyrosines ou histidines n'a encore été mis en évidence dans le cas des histones (Steege *et al.*, 2003).

Il est bien établi depuis bientôt 30 ans que le niveau global de phosphorylation des histones fluctue de manière très marquée au cours du cycle cellulaire (Bradbury *et al.*, 1973),

ce qui se caractérise notamment par l'existence de pics de phosphorylation de l'histone H3 au cours de la mitose (Gurley *et al.*, 1978). Cette phosphorylation affecte le résidu sérine 10 de toutes les molécules d'histone H3 et semble être liée de manière très directe au processus de condensation des chromosomes, phénomène qui sera traité largement plus en détail ultérieurement (Wei *et al.*, 1999).

La phosphorylation des histones est une modification qui semble corrélée à un plus grand nombre de processus cellulaires (Loury et Sassone-Corsi, 2003). De manière analogue à la méthylation, elle est impliquée aussi bien dans des processus impliquant une condensation qu'à d'autres liés à une décompaction de la chromatine, ceci dépendant de la position du résidu affecté, mais également du contexte cellulaire.

#### a) La transcription stimulus-dépendante

Après exposition à un stimulus externe, la cellule répond en déclenchant des cascades de transduction, qui, par des événements de phosphorylation en série, entraînent l'activation de plusieurs protéines régulant la transcription des gènes cibles. Parmi ces protéines, on dénombre, outre de nombreux facteurs de transcription, l'histone H3 (Mahadevan *et al.*, 1991).

Plusieurs travaux ont mis en évidence une phosphorylation de l'histone H3 sur des gènes transcrits en réponse à de nombreux stimuli. À l'exception d'une étude démontrant la phosphorylation de la sérine 28 de l'histone H3 en réponse aux rayons UV (Zhong *et al.*, 2001), ces travaux ont pour la plupart porté sur la modification du résidu sérine 10. Il est cependant fort probable que d'autres résidus, au sein de l'histone H3 ou d'autres histones, puissent également être la cible d'évènements de phosphorylation liés à l'activation de cascades de transduction.

À la différence de la mitose, où la phosphorylation de l'histone H3 est liée à la condensation des chromosomes, ce phénomène stimulus-dépendant, que l'on identifie sous le nom de «réponse nucléosomale», s'accompagne d'une décompaction locale de la chromatine. C'est un évènement transitoire, intervenant généralement entre 15 et 30 minutes après stimulation et de durée variable, dépendant essentiellement de la nature de l'agent stimulateur (Mahadevan *et al.*, 1991).

Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire du Dr. Allis, l'équipe du Dr. Sassone-Corsi a identifié la protéine RSK-2, activée par les voies de transduction ERK, comme une kinase phosphorylant l'histone H3 (Sassone-corsi *et al.*, 1999) ainsi que le facteur

de transcription CREB (De Cesare *et al.*, 1998) après stimulation à l'EGF. Ces résultats furent obtenus à la suite d'une étude menée sur des cellules de patients du syndrome Coffin-Lowry, déficients pour le gène codant pour RSK-2 (Trivier *et al.*, 1996). Dans ces cellules, la réponse transcriptionnelle à l'EGF, et notamment la première vague de transcription, celle durant laquelle les gènes dits « précoces », tel que *c-fos*, sont transcrits, est fortement altérée.

D'autres travaux semblent suggérer que la kinase MSK-1, activée par les voies de transduction ERK et p38, serait responsable de la phosphorylation de l'histone H3 en réponse à l'EGF (Soloaga *et al.*, 2003), mais également suite à de nombreux signaux de stress cellulaire, tels que les rayonnements UV (Thomson *et al.*, 1999).

Plus récemment, il a été montré que la kinase IKK- $\alpha$ , activée en réponse au TNF- $\alpha$ , phosphoryle la sérine 10 de l'histone H3 sur plusieurs gènes activés par le facteur NF- $\kappa$ B (Yamamoto *et al.*, 2003 □ Anest *et al.*, 2003).

La phosphorylation de l'histone H3 a également été observée dans des systèmes physiologiques, notamment en réponse à un signal lumineux entraînant un recadrage de l'horloge biologique. Dans les noyaux suprachiasmatiques de l'hypothalamus, ce signal entraîne l'activation des gènes *c-fos* et *Per-1*, qui s'accompagne d'une phosphorylation transitoire de l'histone H3 sur la sérine 10 (Crosio *et al.*, 2000). D'autres travaux ont abouti à l'observation d'une phosphorylation transitoire de l'histone H3, également couplée à l'induction du gène *c-fos*, dans l'hippocampe d'une souris préalablement traitée à l'acide kaïnique, agoniste des récepteurs glutaminergiques.

La sérine 10 de l'histone H3, phosphorylée par plusieurs kinases, semble ainsi se situer à la croisée de plusieurs voies de transduction. Elle constituerait donc un substrat-clé de l'activation transcriptionnelle en réponse à de nombreux stimuli.

## b) La réparation de l'ADN

L'histone H2AX constitue l'une des trois sous-familles d'histone H2A □ chez les Mammifères, elle représente de 2 à 25% de la totalité des histones H2A présentes dans la chromatine. Chez la Souris, l'invalidation du gène *h2ax* par recombinaison homologue n'est pas létale, mais se caractérise par une sensibilité accrue aux radiations □ liée à des défauts de réparation de l'ADN, causant ainsi une instabilité chromosomique (Celeste *et al.*, 2002).

Les mécanismes moléculaires liant l'histone H2AX à une fonction de surveillance de l'intégrité du génome sont désormais assez bien connus: lors d'une cassure d'un double brin, induite par des agents endommageant l'ADN, tels que les rayons  $\gamma$  il y a phosphorylation de la sérine 139 de H2AX par la kinase ATM, membre de la famille des PI3-kinases, activée très rapidement après génération de cassures double-brin (Rogakou *et al.*, 1998; Burma *et al.*, 2001).

Cet événement de phosphorylation s'étend sur des longueurs de l'ordre de la mégabase autour de la lésion (Rogakou *et al.*, 1999). Bien que cette modification ne constitue pas le signal primaire de la relocalisation des facteurs de réparation vers le point de lésion, elle est nécessaire à leur association en «foci induits par l'irradiation» sur le point de lésion (Celeste *et al.*, 2003).

Il est fort probable que la phosphorylation de la sérine 139 de H2AX constitue un marqueur général des cassures double-brin, occasionnées non seulement après exposition à des agents endommageant l'ADN, mais également lors de processus physiologiques comportant des étapes de recombinaison. C'est ainsi que cette modification a été observée sur les sites de recombinaison méiotique lors du stade spermatocytes primaires (Mahadevaiah *et al.*, 2001), mais également sur les sites de recombinaison V(D)J qui se produisent lors de la maturation des thymocytes (Chen *et al.*, 2000), tous deux phénomènes physiologiques impliquant la génération de cassures double-brin.

### c) L'apoptose

Durant l'apoptose, il y a condensation, puis dégradation de l'ADN en fragments de taille nucléosomale. Ces changements morphologiques s'accompagnent de plusieurs événements de phosphorylation d'histones. C'est ainsi le cas de la phosphorylation de la sérine 14 de l'histone H2B, catalysée par l'enzyme Mst1, après clivage de celle-ci par la caspase-3 (Cheung *et al.*, 2003). D'autres travaux ont également mis en évidence une phosphorylation de la sérine 32, également sur l'histone H2B (Ajiro, 2000), ainsi qu'une phosphorylation de l'histone H2AX sur la sérine 139 (Rogakou *et al.*, 2000), tous deux liés à la fragmentation apoptotique de l'ADN. Ces trois événements de phosphorylation sont sous la dépendance des caspases.

Bien qu'une phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 ait également été observée lors de l'apoptose provoquée par un traitement à la gliotoxine, une toxine fongique

(Waring *et al.*, 1997), la certitude que cet évènement puisse constituer un marqueur général d'apoptose n'est pas acquise. En effet, cette modification n'a pas été observée en réponse à d'autres agents apoptogènes, tel que la privation de sérum (Hendzel *et al.*, 1998).

### C. Les combinaisons de modifications □ potentiels mécanismes d'action

#### 1) L'interdépendance des modifications d'histones

Ainsi qu'il a été exposé ci-dessus, le type de modification, la nature du résidu affecté ainsi que sa position, jouent un rôle fondamental dans l'état de compaction de la chromatine. De plus, il est désormais bien établi que ces modifications peuvent s'«associer» pour former des combinaisons de modifications, apportant un degré supplémentaire de complexité au système. Des études récentes ont ainsi démontré qu'une modification donnée pouvait à son tour influencer la modification d'un autre résidu présent sur la même queue d'histone, ou sur une autre queue.

Afin d'illustrer ce type de régulation, voici trois exemples dans lesquels une modification de la chromatine influence, de manière positive ou négative, la modification d'un autre résidu.

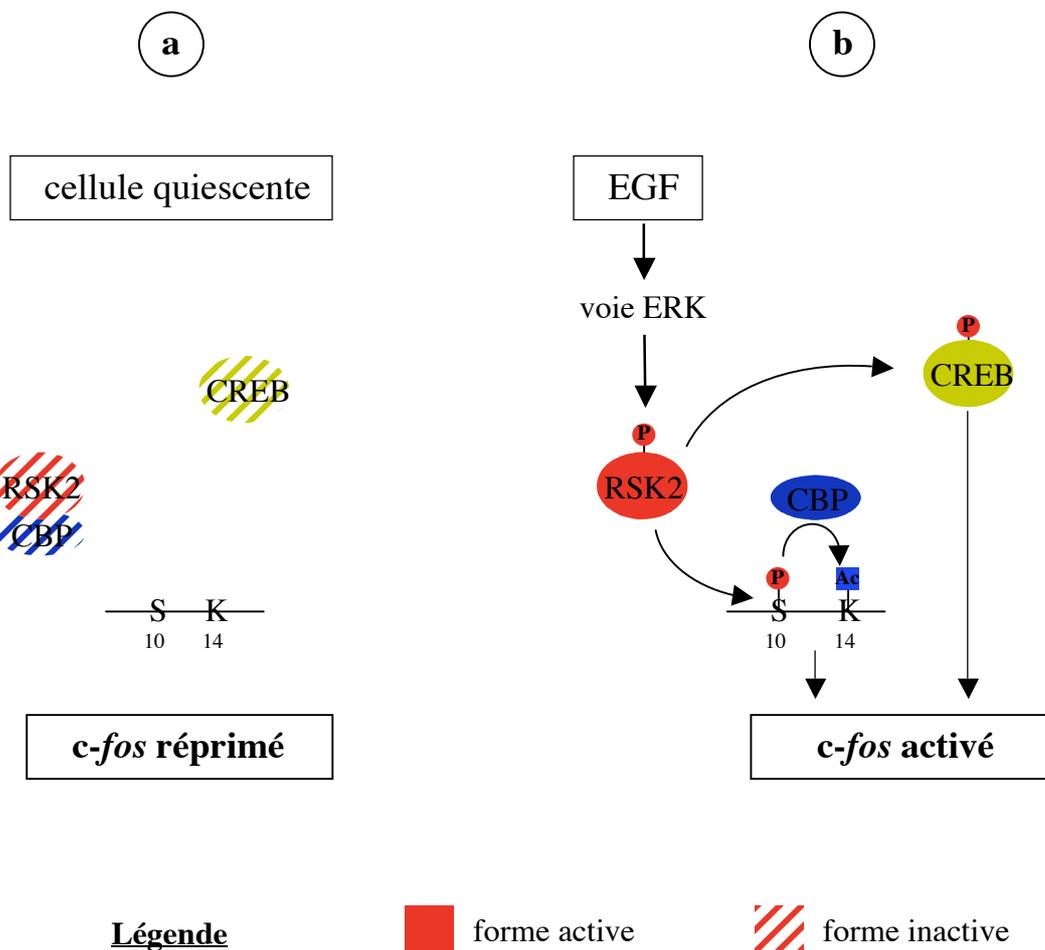
##### a) Cas d'influence positive

Comme il a été décrit ci-dessus, l'activation des gènes précoces en réponse à un stimulus mitogénique, tel qu'un traitement à l'EGF, s'accompagne d'une phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3.

Or, il a été montré par plusieurs études indépendantes que cette phosphorylation favorise une acétylation de l'histone H3 en lysine 14 (Cheung *et al.*, 2000b; Lo *et al.*, 2000; Clayton *et al.*, 2000). Ce mécanisme constitue le premier cas avéré d'interdépendance entre modifications d'histones. D'après des expériences d'acétylation *in vitro*, il semble que l'activité de plusieurs HATs recombinantes, notamment Gcn5 (*S. cerevisiae*) (Cheung *et al.*, 2000b) ainsi que PCAF et p300 (*H. sapiens*) (Lo *et al.*, 2000), envers le résidu lysine 14 est stimulée par la présence d'un groupement phosphate sur la sérine 10. De plus, cette stimulation est abolie après mutation du résidu arginine 164 de Gcn5, situé à proximité de la sérine 10 de l'histone H3 dans la structure du complexe ternaire Gcn5/coenzymeA/histone H3 (Lo *et al.*, 2000).

Cette particularité de reconnaissance du substrat par les HATs permet de développer un modèle d'activation du gène *c-fos* en réponse à l'EGF: d'après ces travaux, la phosphorylation de la sérine 10 constituerait une sorte de marqueur des gènes à activer. Viendrait alors l'étape d'acétylation de la lysine 14, favorisée par la phosphorylation préalable, suivie de l'activation du gène (fig. 5).

D'après des études ultérieures, il semble que ce couplage des activités kinase et acétyltransférase se reflète également au niveau des enzymes elles-mêmes. Dans une cellule quiescente, c'est-à-dire en absence de stimulation externe, la kinase RSK2 et la HAT CBP interagissent pour former un complexe au sein duquel elles sont toutes deux inactives (Mérienne *et al.*, 2001). Après traitement à l'EGF, il y a dissociation du complexe, menant à l'activation de chacune des enzymes (fig. 5).



**Fig. 5: Modèle d'activation de *c-fos* en réponse à l'EGF.** a) dans la cellule quiescente, RSK2 et CBP interagissent sous forme inactive, b) en réponse à l'EGF, la voie ERK active RSK2, qui, dissociée de CBP, phosphoryle l'histone H3 et le facteur de transcription CREB. CBP acétyle l'histone H3 phosphorylée, entraînant ainsi l'activation du gène.

Observée sur d'autres gènes en réponse à d'autres stimuli, la phospho-acétylation de l'histone H3 semble être un mécanisme assez général d'activation transcriptionnelle (Salvador *et al.*, 2001; Lo *et al.*, 2001).

#### b) Cas d'influence négative

Ainsi qu'il a été exposé ci-dessus, tandis que la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par Su(var)h39 est impliquée dans la répression transcriptionnelle et la formation d'hétérochromatine (Nielsen *et al.*, 2001; Rea *et al.*, 2000), la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 par Set9 favorise l'activation transcriptionnelle en permettant le départ du facteur de désacétylation NuRD (Santos-Rosa *et al.*, 2002). Ces deux modifications présentent donc des caractères antagonistes, ce qui se reflète dans l'activité des enzymes impliquées.

Il a ainsi été montré par des tests de méthylation *in vitro* menés sur des peptides mimant l'extrémité N-terminale de l'histone H3, préalablement méthylés sur la lysine 4 ou non, que la méthylation de la lysine 4 inhibe la HMT Su(var)h39, empêchant ainsi la méthylation de la lysine 9 (Nishioka *et al.*, 2002). Ces résultats, qui nécessitent certainement d'être appuyés par des données *in vivo*, laissent entrevoir un mécanisme d'exclusion d'une modification donnée par un autre type de modification.

Dans ces deux cas, les modifications affectent toutes deux des résidus voisins au sein de la même extrémité N-terminale d'histone. Ces résultats ayant été obtenus par l'utilisation de protéines recombinantes, il semble que l'influence, négative ou positive, d'une modification sur une autre, puisse en grande partie s'expliquer par des spécificités d'affinité entre enzyme et substrat.

Une étude plus récente, décrivant pour la première fois un couplage entre deux modifications présentes sur deux queues d'histones différentes, laisse supposer cependant l'existence de mécanismes plus complexes.

#### c) Cas de régulation trans-histones

Ainsi qu'il a été exposé précédemment, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, bien que généralement observée sur des gènes actifs et liée à l'activation transcriptionnelle, semble dans certains cas déroger à cette règle et être liée à la répression de certains loci, tels que les télomères et l'ADN codant pour l'ARN ribosomal (rDNA) (Briggs *et al.*, 2001).

Des expériences de mutation menées chez la levure ont montré que l'enzyme Rad6, qui possède une activité de conjugaison à l'ubiquitine, est indispensable à la maintenance de l'état de répression de ces loci (Huang *et al.*, 1997). Or, une étude récente a démontré que la délétion du gène *rad6*, ainsi que la mutation de la lysine 123 de l'histone H2B ubiquitinylée par Rad6 *in vitro*, interfèrent toutes deux avec la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (Sun et Allis, 2002). Il paraît donc vraisemblable que l'enzyme Rad6 modifie la lysine 123 de l'histone H2B par ubiquitination, ce qui favoriserait, par un mécanisme moléculaire qu'il reste encore à découvrir, la méthylation de la lysine 4 de l'histone H3, nécessaire à la répression transcriptionnelle.

Ces trois séries de résultats nous permettent de définir trois mécanismes régissant l'interdépendance des modifications d'histones:

- une régulation positive en cis
- une régulation négative en cis
- une régulation positive en trans

Un mécanisme de régulation négative en trans ne semble cependant pas improbable, bien qu'aucun exemple n'en ait encore été offert.

## **2) Les mécanismes moléculaires**

### **a) L'hypothèse «électrostatique»**

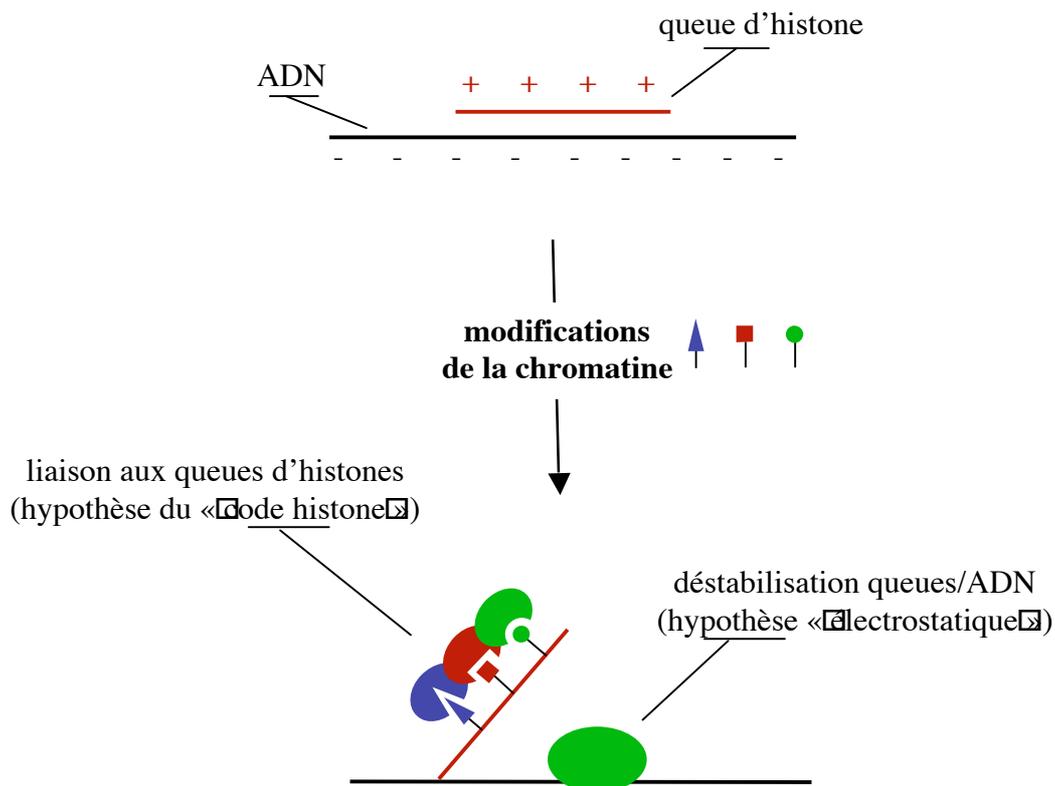
Pendant longtemps, l'hypothèse majeure concernant le mode d'action des modifications d'histones sur la régulation des processus cellulaires liés à l'ADN, hypothèse que l'on peut qualifier d'«électrostatique», s'appuyait principalement sur des travaux d'acétylation des histones au cours de l'activation transcriptionnelle.

Il semblerait que les queues des histones H3 et H4 soient en contact avec l'ADN nucléosomal (Banères *et al.*, 1997): cette interaction est assurée par l'attraction électrostatique existant entre les résidus lysine de ces queues, chargés positivement à pH cellulaire, et l'ADN, chargé négativement. L'acétylation de ces résidus basiques, neutralisant leur charge, affaiblirait ces interactions. Il a ainsi été montré que l'acétylation de la queue de l'histone H4 réduit son affinité *in vitro* pour un ADN de longueur nucléosomale (Hong *et al.*, 1993). L'ADN devient alors accessible aux facteurs de transcription (Lee *et al.*, 1993).

Cependant, l'abondance des modifications potentielles, ainsi que la complexité des liens d'interdépendance, laissent supposer que les mécanismes moléculaires régulant l'état de compaction de la chromatine sont plus complexes que ceux proposés par l'hypothèse électrostatique.

#### b) L'hypothèse du «code histone»

L'hypothèse plus récente du «code histone», dont de nombreuses études continuent à confirmer la validité, stipule que le nucléosome peut être considéré comme une page blanche, sur laquelle des caractères (les modifications d'histones) s'associeraient pour former des mots (les combinaisons de modifications), lesquels seraient déchiffrés par des protéines pouvant les fixer. Ces protéines seraient responsables, par des mécanismes qu'il reste encore en grande partie à élucider, d'une altération ou de la maintenance de l'état de compaction de la chromatine (Strahl et Allis, 2000).



**Fig. 16: Modèle d'action des modifications d'histones intégrant les deux hypothèses majeures.**

L'existence au sein de nombreuses protéines, de modules de liaison aux modifications de la chromatine, bromodomaine et chromodomaine, respectivement spécifiques à

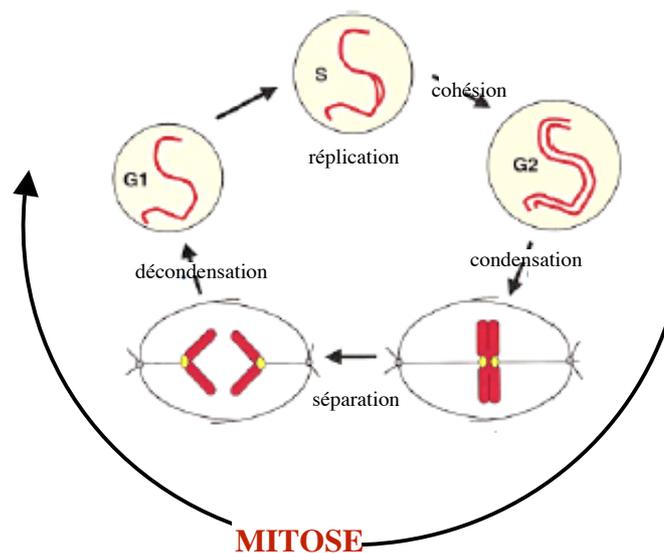
l'acétylation et à la méthylation, semble confirmer cette théorie. En revanche, bien que l'existence de domaines d'interaction avec des résidus phosphorylés soit avérée (Yaffe et Elia, 2001), aucune étude n'a jusqu'à présent démontré leur intervention dans le contexte de la chromatine.

Ce modèle du «code histone» n'entame cependant pas le bien-fondé de l'hypothèse électrostatique et il est probable que les deux mécanismes proposés concourent simultanément à la régulation de l'état de compaction de l'ADN (fig. 6).

## II. LA CONDENSATION MITOTIQUE DE L'ADN

Lors de la mitose, l'ADN traverse des étapes de condensation et de ségrégation, nécessaires à la transmission d'une copie du génome à chacune des deux cellules-filles. Les changements drastiques qu'ils entraînent dans l'organisation de la chromatine sont le résultat de l'action concertée de nombreux effecteurs et régulateurs mitotiques. Cette partie sera entièrement consacrée à la description de certains effecteurs majeurs de la dynamique de l'ADN.

Tandis que la cohésion entre chromatides est établie dès la phase S, de manière concomitante à la réplication de l'ADN, la condensation des chromosomes, initiée à partir du centromère, ne débute qu'en phase G2. Lors de la prophase, la condensation progresse en direction des télomères et atteint un maximum en métaphase. Les chromosomes se positionnent alors sur la plaque équatoriale, plan situé à mi-distance entre les centrosomes. Une fois leurs deux kinétochores rattachés aux pôles par les microtubules du fuseau, les chromatides se séparent. Durant l'anaphase, elles sont tirées vers les pôles par le fuseau. Il y a alors décondensation progressive de l'ADN qui devient quasi-complète en télophase (fig. 7).



**Fig. 7: Le cycle du chromosome.** (d'après Losada et Hirano, 2001a)

## **A. Les facteurs protéiques dans la condensation**

### **1) La machinerie transcriptionnelle et les facteurs de transcription**

La mitose a longtemps été considérée comme une phase dépourvue de toute activité transcriptionnelle. La majeure partie des facteurs de transcription et des composants de la machinerie transcriptionnelle est en effet inactivée lors de l'entrée en mitose (Gottesfeld et Forbes, 1997).

Il a cependant été démontré que le gène codant pour la cycline B1 s'exprimait en mitose, et ceci à des taux plus élevés qu'en interphase (Sciortino *et al.*, 2001). De plus, son promoteur, accessible aux enzymes de restriction, est occupé par le facteur de transcription NF-Y. Ces données semblent corroborées par deux études indépendantes montrant qu'une faible fraction de l'activateur général de transcription TFIID, ainsi que de sa sous-unité TBP («TATA-binding protein»), demeure localisée sur les chromosomes en mitose (Segil *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2002).

Il semblerait d'après ces travaux que certaines régions de la chromatine conservent des taux de compaction bien inférieurs au reste du chromosome, permettant ainsi la transcription de certains gènes qui pourraient avoir une fonction spécifique à la mitose.

### **2) Les acteurs de la dynamique mitotique de l'ADN**

#### **a) Les complexes à protéines SMC**

Parmi les facteurs protéiques impliqués dans la condensation des chromosomes, on dénombre deux complexes multiprotéiques: la condensine et la cohésine, jouant respectivement un rôle dans la condensation de l'ADN et dans la cohésion inter-chromatides. Toutes deux sont constituées de protéines SMC et non-SMC (Jessberger, 2002).

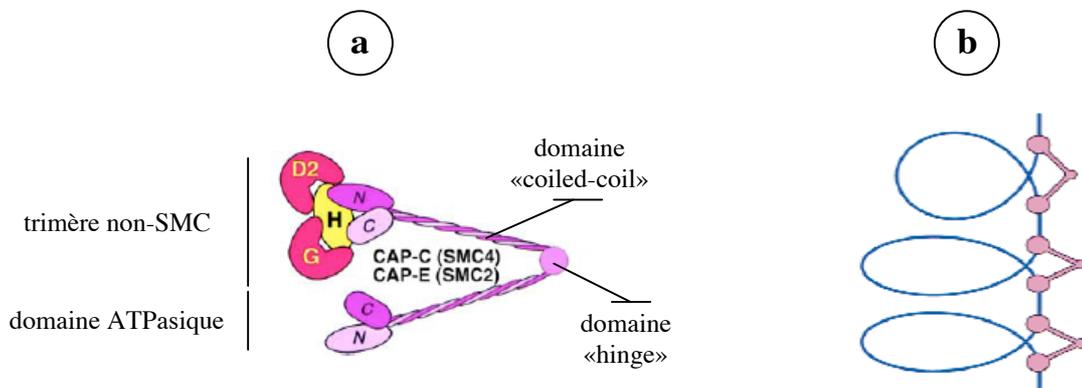
Les protéines SMC («structural maintenance of chromosomes»), au nombre de six chez les eucaryotes supérieurs (SMC-1, -2, -3, -4, -5 et -6), sont des protéines d'assez haut poids moléculaire (entre 1000 et 1400 acides aminés). Leur structure primaire est très conservée de la bactérie à l'homme. Elles s'hétérodimérisent pour former des complexes en forme de V (Melby *et al.*, 1998), aux extrémités desquels se situent des domaines ATPasiques, indispensables à leur activité (Löwe *et al.*, 2001). Tandis que le complexe SMC-

SMC-6 semble jouer un rôle dans la réparation de l'ADN (Taylor *et al.*, 2001), les deux autres complexes assurent principalement des fonctions mitotiques.

### i- Le complexe condensine

Le complexe condensine (également appelé «complexe 13S» d'après son coefficient de sédimentation) résulte de l'association d'un dimère SMC-2/SMC-4 (CAP-E/CAP-C, ou «complexe 8S») et d'un trimère non-SMC CAP-D2/CAP-G/CAP-H (associées en «complexe 11S») (fig. 8a) (Hirano *et al.*, 1997). Chacune de ces cinq sous-unités est essentielle chez la levure (Saka *et al.*, 1994; Sutani *et al.*, 1999). Sa fonction dans la condensation a été découverte à la suite de tests effectués dans des extraits d'œuf de *X. laevis*, système couramment utilisé pour l'étude de la condensation des chromosomes. D'après des expériences d'immunodéplétion de ces extraits, la condensine est absolument nécessaire à la condensation des chromosomes (Hirano *et al.*, 1997).

Les mécanismes par lesquels la condensine participe à la condensation des chromosomes demeurent obscurs. Il semblerait qu'elle favorise, dans l'ADN auquel elle se lie, la création et la maintenance de boucles d'orientation positive (Kimura et Hirano, 1997), permettant ainsi un pontage intra-moléculaire (fig. 8b).



**Fig. 8: Structure et modèle d'action de la condensine.** a) La condensine est constituée d'un dimère SMC-2/SMC-4 et d'un trimère de protéines non-SMC (d'après Hirano, 2002). b) Elle favoriserait, par la création et la maintenance de boucles d'orientation positive, le pontage intra-moléculaire au sein d'un brin d'ADN (d'après Hirano, 1999).

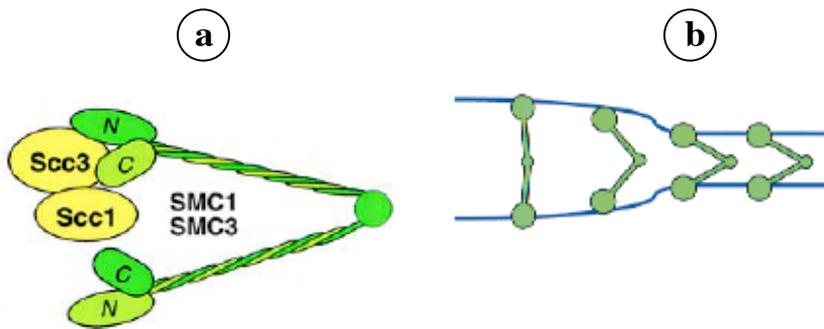
De localisation cytoplasmique en interphase, la condensine devient nucléaire en fin de phase G2, s'associant à la chromatine jusqu'en métaphase, selon un programme spatio-

temporel exactement identique à celui de la condensation des chromosomes. Elle quitte progressivement les chromosomes durant la décondensation et redevient cytoplasmique en G1 (fig. 10) (Schmiesing *et al.*, 2000).

## ii- Le complexe cohésine

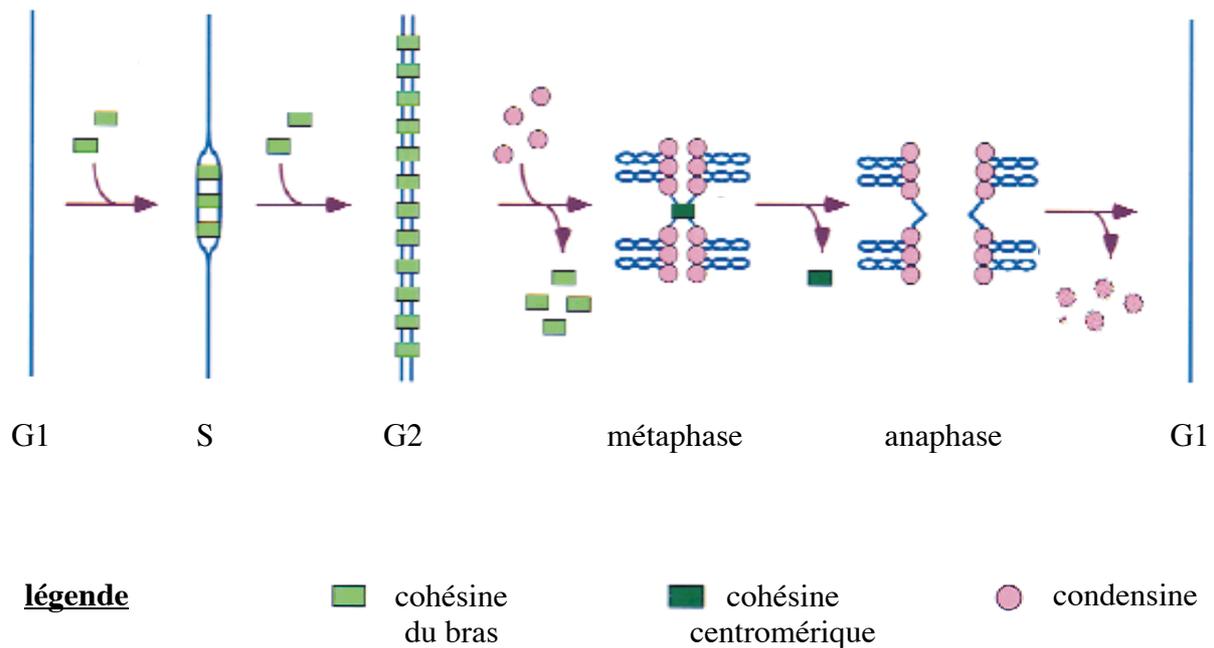
Le complexe cohésine est formé de l'hétérodimère SMC-1/SMC-3 ainsi que de deux protéines non-SMC, Scc1 et Scc3 (fig. 9a) (Losada *et al.*, 1998). Des souches mutantes de levure pour la cohésine perdent des chromosomes à des fréquences anormalement élevées et présentent une séparation prématurée des chromatides (Michaelis *et al.*, 1997).

Bien que les bases moléculaires de ses propriétés mécaniques n'aient pas encore été découvertes, il semble très probable que le complexe cohésine agisse en tant que "linker" inter-moléculaire entre deux brins d'ADN, ce qui expliquerait ses capacités d'aggrégation de l'ADN *in vitro* (fig. 9b) (Losada et Hirano, 2001b).



**Fig. 9: Structure et modèle d'action de la cohésine.** a) La cohésine est constituée d'un dimère SMC-1/SMC-3 et d'un dimère non-SMC (d'après Hirano, 2002). b) Elle favoriserait le pontage inter-moléculaire entre deux brins d'ADN (d'après Hirano 1999).

La cohésine s'associe dès la phase S avec la chromatine en réplication. 95% s'en dissocie lors de l'entrée en mitose (Sumara *et al.*, 2000), remplacée par la condensine. La cohésion entre chromatides est alors assurée par la fraction résiduelle de cohésine qui reste associée au centromère jusqu'à la transition métaphase-anaphase, lors de la séparation des chromatides, au cours de laquelle elle est définitivement écartée de la chromatine (fig. 10) (Waizenegger *et al.*, 2000). □



**Fig. 10: L'association de la condensine et de la cohésine avec la chromatine est régulée au cours du cycle.**  
(d'après Hirano, 1999)

### b) La topoisomérase II □

Les DNA-topoisomérases sont une classe d'enzymes nécessaires à la résolution de problèmes topologiques lors de plusieurs processus liés au métabolisme de l'ADN, notamment la transcription, la réplication, la recombinaison et la dynamique des chromosomes mitotiques (Wang, 2002). Elles catalysent le clivage d'un brin d'ADN, et font passer un second brin d'ADN à travers la cassure qu'elles referment en fin de réaction.

L'isoforme II □ est particulièrement abondante sur les chromosomes mitotiques (Christensen *et al.*, 2002). Elle semble y jouer deux rôles □ruciaux:

- dans la ségrégation des chromosomes, qu'elle favorise en permettant la résolution des chromatides et des chromosomes (Gimenez-Abian *et al.*, 1995).
- dans la condensation des chromosomes, bien que sa fonction exacte dans ce processus soit encore inconnue (Uemura *et al.*, 1987).

Ainsi que nous l'avons vu, de nombreux facteurs protéiques participent à la régulation de la dynamique chromatinienne en mitose. Cependant, outre les changements d'environnement protéique, la condensation des chromosomes s'accompagne de plusieurs modifications d'histones, spécifiques à la mitose.

## **B. Les queues d'histones dans la condensation**

### **1) Des acteurs essentiels à la condensation**

Le rôle des queues d'histones dans la condensation est crucial, ainsi qu'il a été démontré par des expériences de condensation *in vitro*: lorsque de la chromatine de spermatozoïdes de *X. laevis* est incubée en présence d'extrait mitotique d'œufs de la même espèce, l'ADN, qui subit d'abord une étape de décompaction, se condense en chromosomes. Cette condensation est inhibée par l'ajout d'oligosomes intacts, mais n'est pas affectée lorsque les oligosomes sont privés des queues d'histones par digestion à la trypsine (de la Barre *et al.*, 2000). Les auteurs interprètent cet effet d'inhibition par la séquestration de facteurs cruciaux à la condensation par les queues d'histones. Des approches similaires ont montré que la queue de l'histone H2B était nécessaire, à un degré très supérieur à celle des autres histones, à la condensation des chromosomes (de la Barre *et al.*, 2001).

Quant à l'interaction éventuelle de facteurs de condensation avec les queues d'histone que ces résultats laisseraient supposer, il n'en existe aucune preuve formelle. Ces mêmes auteurs ont montré que la topoisomérase II □ et le complexe condensine interagissaient avec les nucléosomes, mais de manière indépendante des queues d'histones (de la Barre *et al.*, 2000); d'autres ont au contraire mis à jour une interaction entre la sous-unité CAP-D2 de la condensine et la queue de l'histone H3, conférant ainsi à cette dernière une fonction potentielle de récepteur à la condensine (Schmiesing *et al.*, 2000; Ball *et al.*, 2002).

### **2) La phosphorylation mitotique des histones**

La phosphorylation mitotique des histones fut observée pour la première fois en 1973 (Bradbury *et al.*, 1973). D'un niveau faible pour les histones H2A, H2B et H4, elle est très massive pour les histones H1 et H3, pour lesquelles toutes les molécules semblent être modifiées.

### a) La phosphorylation de l'histone H1

Lors de l'entrée en mitose, il y a hyperphosphorylation de l'histone «linker» H1 sur de nombreux sites. Il semblerait que cet évènement soit sous la dépendance de la kinase cdc2 (Langan *et al.*, 1989). En raison des caractéristiques temporelles de cette modification, il a longtemps été postulé que cette modification était nécessaire à la condensation des chromosomes (Bradbury, 1992; Roth et Allis, 1992). Or des expériences menées *in vivo* et *in vitro* ont montré que ce processus n'était pas affecté par l'absence de l'histone H1 (Shen *et al.*, 1995; Ohsumi *et al.*, 1993), ni par l'absence de phosphorylation (Guo *et al.*, 1995). Ainsi, la fonction de cette modification reste encore inconnue.

### b) La phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3

De manière analogue à l'hyperphosphorylation de l'histone H1, la phosphorylation de l'histone H3 a été observée chez de nombreux organismes et semble ainsi constituer un marqueur universel de la mitose (Hendzel *et al.*, 1997; van Hooser *et al.*, 1998 □ Hsu *et al.*, 2000 □ Kaszas et Cande, 2000). Une phosphorylation massive de la sérine 10 de l'histone H3 se produit également lors des deux divisions méiotiques, selon des modalités spatio-temporelles identiques à la phosphorylation mitotique.

#### i- Corrélation spatio-temporelle avec la condensation des chromosomes

Jusqu'à une époque assez récente, la caractérisation précise des modifications d'histones *in vivo* semblait quasi-impossible, faute d'outils adaptés. La génération d'un anticorps polyclonal dirigé de manière très spécifique contre l'histone H3 phosphorylée sur la sérine 10 a permis l'étude de cette modification en corrélation avec la condensation des chromosomes.

D'après des études menées sur *Tetrahymena thermophila* (Hendzel *et al.*, 1997), travaux confirmés ultérieurement chez de nombreux organismes, la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 accompagne de manière très stricte le déroulement de la condensation des chromosomes. Il y a tout d'abord phosphorylation de l'histone H3 dans l'hétérochromatine péricentromérique en fin de phase G2. Lors de la prophase, période durant laquelle la chromatine se condense, il y a «allongation» de cette modification le long des bras



des défauts de ségrégation, caractérisés par la présence de bras de chromosomes demeurant sur la plaque équatoriale lors de l'anaphase, signe d'une condensation imparfaite de l'ADN: les chromosomes ne peuvent supporter les forces de traction exercées sur eux par le faisceau mitotique et sont sujets à des cassures. Les cellules-filles issues de la mitose présentent des taux d'aneuploïdie anormalement élevés.

Quant aux mécanismes moléculaires par lesquels la phosphorylation de l'histone H3 serait responsable de la condensation, deux modèles ont été avancés :

- selon le premier d'entre eux, la phosphorylation induirait une baisse d'affinité de la queue de l'histone H3 pour l'ADN nucléosomal, devenant dès lors accessible aux polyamines (Sauvé *et al.*, 1999), polycations organiques associés aux chromosomes mitotiques et pouvant induire une condensation de la chromatine *in vitro* (Hougaard *et al.*, 1987; Smirnov *et al.*, 1988). Ce mécanisme est en accord avec l'hypothèse « électrostatique » des modifications d'histones.

- selon le second modèle, la queue de l'histone H3 phosphorylée aurait une fonction de récepteur à un facteur de condensation, ce qui favoriserait l'hypothèse du « code histone ». Cependant, aucune étude n'a encore permis l'identification d'un tel facteur. L'interaction observée entre la sous-unité CAP-D2 de la condensine et la queue de l'histone H3 ne semble pas dépendre de l'état de phosphorylation de la sérine 10 (Schmiesing *et al.*, 2000; Ball, *et al.*, 2002).

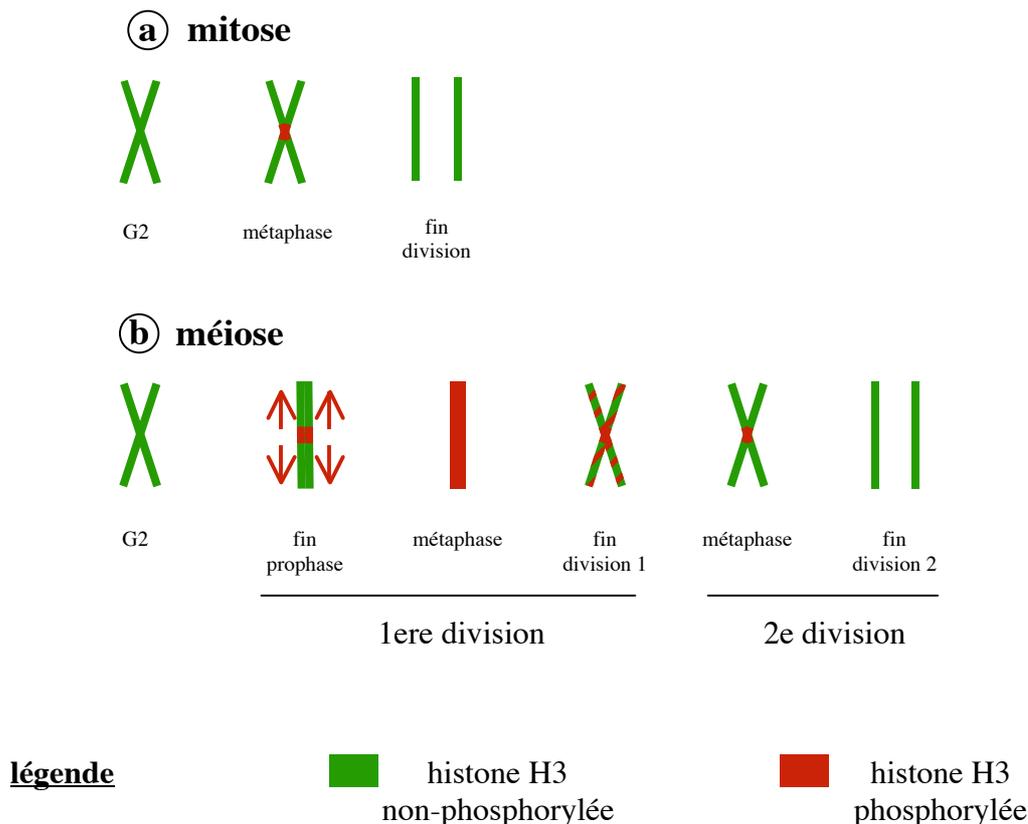
La corrélation spatio-temporelle entre la phosphorylation de l'histone H3 et la condensation des chromosomes ayant été observée chez de nombreuses espèces, il était tentant de penser que cette modification mitotique était, à l'exemple de *T. thermophila*, universellement nécessaire à la compaction de l'ADN. Cependant, la mutation de la sérine 10 en alanine chez *S. cerevisiae* n'affecte pas de manière détectable la condensation □ la mitose et la méiose se déroulent de manière normale, et la souche mutante pousse à une vitesse similaire à une souche de type sauvage (Hsu *et al.*, 2000). Ainsi, il semblerait que chez la levure la phosphorylation de l'histone H3 ne soit pas nécessaire à la condensation.

#### - Rôle dans la cohésion interchromatides chez les plantes

Chez les plantes, les caractéristiques spatio-temporelles de phosphorylation de l'histone H3 sont très différentes de celles s'appliquant à la condensation des chromosomes (Kaszas et

Cande, 2000). Lors de la division mitotique, la phosphorylation de l'histone H3 ne débute qu'en fin de prophase, à un stade où les chromosomes sont déjà entièrement condensés, et ne concerne que l'hétérochromatine péricentrique (fig.12a). En méiose, la situation est compliquée par l'existence de deux vagues successives de phosphorylation, de profils fort différents: lors de la première division méiotique, la phosphorylation débute également en prophase à partir du centromère, mais s'étend à la totalité du chromosome en métaphase. Il y a alors déphosphorylation sélective des molécules d'histone H3 situées sur les bras du chromosome pour ne laisser lors de la métaphase II qu'une fraction d'H3 modifiée sur l'hétérochromatine péricentrique. Cette population sera également déphosphorylée à l'issue de la deuxième division (fig. 12b).

Ainsi, dans ces trois situations, la division mitotique et les deux méiotiques, la localisation dynamique de la phosphorylation de l'histone H3 semble plutôt évoquer celle des sites de cohésion interchromatides. Il semblerait donc que chez les plantes, la phosphorylation de l'histone H3 ne soit pas liée à la condensation, mais plutôt à la cohésion.



**Fig. □2: Corrélation entre la phosphorylation de l'histone H3 et la cohésion interchromatides chez les plantes.**

Cependant, contrairement aux animaux, chez lesquels la phosphorylation accompagne la condensation de manière stricte, chez les plantes, elle n'est pas entièrement liée à la cohésion. En effet, aussi bien lors de la mitose que de la première division méiotique, la phosphorylation de la sérine 10 n'a lieu que bien après l'établissement de la cohésion. Il semble donc peu probable, à la différence de l'hypothèse avancée pour la condensation chez les animaux, que la phosphorylation soit responsable de la cohésion chez les plantes.

#### - Hypothèse du «ready production label»

Quel que soit le moment de l'initiation de la phosphorylation de l'histone H3, phase G2 chez la plupart des organismes et fin de prophase chez les plantes, ainsi que son étendue spatiale, réduite à l'hétérochromatine péricentrique chez ces dernières, ou affectant toutes les molécules d'histone H3, cette modification semble toujours maximale lors de la métaphase, lorsque les chromosomes sont positionnés sur un plan équatorial, prêts à être ségrégués.

C'est sur la base de cette dernière constatation que repose l'hypothèse du «ready production label», expression difficilement traduisible en français, selon laquelle la phosphorylation de l'histone H3 constituerait une «étiquette» («label»), un signal informant la cellule que les chromosomes sont correctement condensés et qu'elle peut procéder à l'étape irréversible de séparation des chromatides (Hans et Dimitrov, 2001). Il est intéressant de noter que le modèle du «ready production label» suggère une relation inverse de celle proposée par l'hypothèse de la condensation: ici, la phosphorylation devient la conséquence de la condensation des chromosomes.

#### c) La phosphorylation d'autres résidus d'histones

D'autres évènements de phosphorylation des queues d'histones ont également été observés lors de la mitose. De découverte plus récente que la phosphorylation de la sérine 10, la fonction exacte de ces modifications n'est pas encore établie. Elles affectent les résidus suivants □

- **la sérine 28 de l'histone H3**, précédée de résidus identiques à ceux situés en amont de la sérine 10 (ARKS). De plus, les caractéristiques spatio-temporelles de cet évènement de phosphorylation sont similaires à celles observées pour la sérine 10 (Goto *et al.*, 1999) (fig. 11). Ces similitudes laissent supposer l'implication d'une kinase commune aux deux résidus.

- **la sérine 7 de CENP-A.** CENP-A est un variant centromérique de l'histone H3, présentant une structure similaire à celle-ci (Sullivan *et al.*, 1994). Elle est essentielle à l'organisation de la chromatine centromérique (Howman *et al.*, 2000), où elle semble se substituer à l'histone H3 dans la composition des nucléosomes (Yoda *et al.*, 2000). Bien que l'extrémité N-terminale de CENP-A ne présente que peu d'homologies avec la queue de l'histone H3, il est intéressant de noter que la sérine 7 partage également avec la sérine 10 de l'histone H3 l'environnement peptidique ARKS. Cette modification, forcément restreinte au centromère, présente une cinétique différente de la phosphorylation de la sérine 10 □ elle ne débute qu'en prophase, atteint également un pic en métaphase avant de diminuer rapidement, devenant indétectable lors de l'anaphase (Zeitlin *et al.*, 2001a).

- **la thréonine 11 de l'histone H3**, phosphorylée par la kinase Dlk, et qui ne semble concerner que les histones situées dans l'hétérochromatine péricentrique; elle présente une dynamique similaire à celle de la phosphorylation de la sérine 7 de CENP-A (Preuss *et al.*, 2003).

Ces trois modifications, ainsi que la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3, présentent entre elles des différences spatio-temporelles. La découverte d'autres types de modifications, affectant l'histone H3 ou d'autres histones, sur lesquelles nous ne possédons que très peu d'informations, complètera certainement notre connaissance de la combinaison mitotique du code histone, tout autant qu'elle soulèvera d'interrogations quant à la nature des mécanismes déclenchés par l'ensemble, ou par une partie, de cette combinaison.

### **III. LA FAMILLE DES KINASES MITOTIQUES AURORA**

Intervenant tout aussi bien dans la dynamique des principaux protagonistes de la ségrégation, tels que chromosomes, centrosomes et fuseau mitotique, que dans l'activation des points de contrôle nécessaires à sa surveillance, plusieurs kinases sont essentielles au déroulement de la mitose (Nigg, 2001). Parmi celles-ci, on dénombre les CDKs («cyclin-dependent kinases»), principales régulatrices de l'entrée en mitose, mais également plusieurs familles de découverte plus récente, comme les kinases Plk («Polo-like kinases»), les Nek («NIMA-related kinases») et les kinases Aurora.

Les kinases Aurora sont des acteurs cruciaux de la ségrégation des chromosomes. Nous allons passer en revue leurs fonctions mitotiques, ainsi que certaines caractéristiques de leur régulation.

#### **A. Caractéristiques générales des kinases Aurora**

##### **1) Les kinases Aurora au cours de l'évolution**

Tandis que chez la levure, il n'a été identifié qu'un seul membre de cette famille de kinases, Ipl1 chez *S. cerevisiae* et Ark1 chez *S. pombe*, on en dénombre deux chez *X. laevis*, *C. elegans* et *D. melanogaster*, et trois chez les Mammifères. En raison du grand nombre d'appellations attribuées à chacune de ces kinases (cf. annexe I), une nomenclature unifiée a récemment été proposée (Nigg, 2001), les classant, selon leurs degrés d'homologies de séquence et de fonction, sous les noms d'Aurora-A, -B et -C, du nom du premier gène cloné chez *D. melanogaster* (Glover *et al.*, 1995).

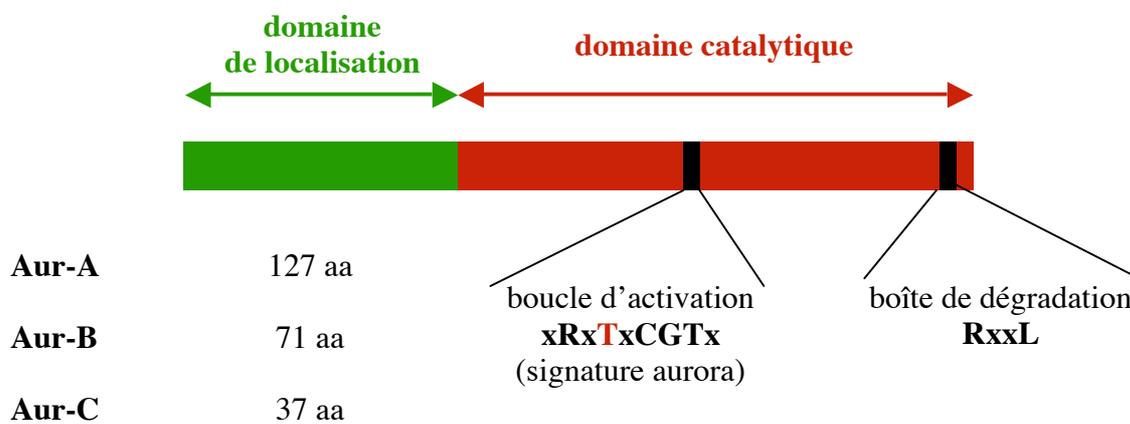
Le fait que le nombre de gènes *aurora* augmente avec le degré d'évolution de l'espèce a été fréquemment interprété par l'existence de fonctions distinctes pour Aur-A, -B et -C, mais regroupées sous la seule protéine Ipl1 chez la levure. Cependant, et ainsi que l'atteste la fréquence croissante du terme «Ipl1/Aur-B» dans les publications, il existe une très forte homologie de fonction entre Aur-B et Ipl1, non démontrée pour les autres Aurora. Les fonctions Aur-A et Aur-C pourraient n'être apparues que plus tardivement dans l'évolution, ou peut-être sont-elles assurées par d'autres kinases chez la levure.

De même, pour les espèces ne comptant que deux membres de cette famille, chez lesquelles c'est un éventuel homologue du gène Aur-C qui fait défaut, rien ne permet encore

de conclure à l'existence d'une fonction Aur-C, fonction qui pourrait être assurée par une autre kinase Aurora, ou par une kinase d'une autre famille.

## 2) Structure primaire des kinases Aurora

Les gènes *aurora* codent pour des kinases qui phosphorylent les résidus sérines et thréonines. Aucun site consensus de phosphorylation n'a encore été défini pour ces kinases, cependant il semble qu'Aur-B soit sensible à la présence de résidus arginine autour du résidu ciblé (Sugiyama *et al.*, 2002). Leur séquence primaire (cf. annexe II) peut se subdiviser en deux domaines principaux (fig. 13).



**Fig. 13: Structure primaire des kinases Aurora.** La longueur du domaine N-terminal des différentes kinases Aurora humaines est indiquée.

Le domaine N-terminal des kinases Aurora, riche en résidus basiques, est de longueur et de séquence très variables selon le membre de la famille. D'après des expériences d'expression d'une protéine de fusion GFP dans une lignée de cellules de *X. laevis*, il semblerait que ce domaine soit déterminant pour la localisation centrosomale de la protéine Aurora-A (Giet et Prigent, 2001). Bien que cette technique n'ait à notre connaissance pas été appliquée à la protéine Aur-B, des approches plus indirectes ont cependant permis d'aboutir à des conclusions similaires □ Aur-B interagit tout au long de la mitose, grâce à son domaine N-terminal (Bolton *et al.*, 2002), avec la protéine INCENP, qui lui confère sa localisation (Adams *et al.*, 2000).

Le domaine C-terminal, catalytique, est d'une longueur d'environ 250 acides aminés. □ Il est organisé en douze sous-domaines, caractéristique fréquente des sérine/thréonine-kinases (Hanks *et al.*, 1988). De manière commune aux trois Aurora, se situe dans ce domaine un motif d'activation, caractéristique des kinases Aurora, ainsi qu'un motif de dégradation, dont la fonctionnalité a été prouvée chez Aur-A (Arlot-Bonnemains *et al.*, 2001).

### **3) Profil d'expression des kinases Aurora**

Aur-A et Aur-B sont toutes deux exprimées principalement dans des tissus à haut taux de prolifération cellulaire, comme le thymus, la rate, l'intestin et le testicule, illustrant ainsi la fonction mitotique de ces kinases (Kimura *et al.*, 1997a □ Kimura *et al.*, 1998). Cependant, tandis que l'expression d'Aur-B semble homogène entre ces tissus, Aur-A est beaucoup plus abondante dans le testicule, à haute activité méiotique, que dans les autres tissus. Il en est de même pour Aur-C, qui n'a été détectée que dans le testicule (Kimura *et al.*, 1999). Les kinases Aurora présentent ainsi des profils d'expression tissulaire distincts, reflétant très probablement des degrés d'implication différents, mais non élucidés, dans les divisions mitotique et méiotique.

De nombreux travaux ont mis en évidence une forte régulation de l'expression des Aurora au cours du cycle. Pour chacun des trois gènes, l'abondance, aussi bien au niveau ARNm qu'au niveau protéique, est faible en phase G1, augmente fortement lors de la phase G2 pour atteindre un pic en mitose, au terme de laquelle elle décroît rapidement (Kimura *et al.*, 1997a; Kimura *et al.*, 1998; Kimura *et al.*, 1999). Aucune étude n'a encore permis d'établir les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'augmentation du niveau d'expression des kinases Aurora. En revanche, de manière analogue à d'autres régulateurs mitotiques (Glotzer *et al.*, 1991), la soudaine baisse du niveau d'Aur-A en fin de mitose semble régulée par ubiquitination dépendant de l'APC («anaphase-promoting complex»), puis dégradation par le protéasome (Honda *et al.*, 2000).

### **4) Régulation de l'activité des kinases Aurora**

De manière parallèle à l'activité des gènes Aurora, l'activité catalytique des trois kinases, dépendant de leur état de phosphorylation, atteint un maximum lors de la mitose, confirmant ainsi leur statut de kinases mitotiques (Kimura *et al.*, 1997a).

La phosphorylation mitotique du résidu thréonine 288 de la kinase Aur-A humaine, situé au sein de la boucle d'activation, constituerait l'un des éléments majeurs de sa stimulation (Walter *et al.*, 2000). La forme phosphorylée d'Aur-A est plus active que la forme native de la protéine. Des travaux plus récents semblent démontrer qu'il s'agit d'un évènement d'autophosphorylation, favorisé par la présence de la protéine TPX2 (Eyers *et al.*, 2003). Bien qu'il n'existe aucune certitude concernant le statut de phosphorylation des autres kinases Aurora, il est cependant intéressant de noter que le résidu thréonine 288 de la kinase Aur-A est extrêmement conservé d'un point de vue évolutif, et qu'il est présent au sein des autres Aurora. Il est donc fort probable que ce résidu-clé soit également impliqué dans la régulation de celles-ci.

Plusieurs éléments permettent d'affirmer que l'activité des kinases Aurora est étroitement régulée par les protéine-phosphatases de type I:

- d'après des expériences de génétique menées chez la levure, il semblerait que la protéine-phosphatase de type I (PP1) joue un rôle antagoniste à la fonction d'Ipl1. En effet, la mutation du gène *glc-7*, codant pour une sous-unité catalytique de la PP1, peut partiellement supprimer le phénotype mutant *ipl1*, tandis que sa surexpression en accentue les traits (Francisco *et al.*, 1994).

- Des tests de déphosphorylation menés *in vitro* avec la PP1 et la PP2A sur une kinase Aur-B immunoprécipitée réduisent l'activité de cette kinase (Sugiyama *et al.*, 2002). Quant à Aur-A, seul un traitement à la PP1, et non à la PP2A, entraîne un tel effet, qui s'accompagne d'une déphosphorylation de la thréonine 288 (Walter *et al.*, 2000).

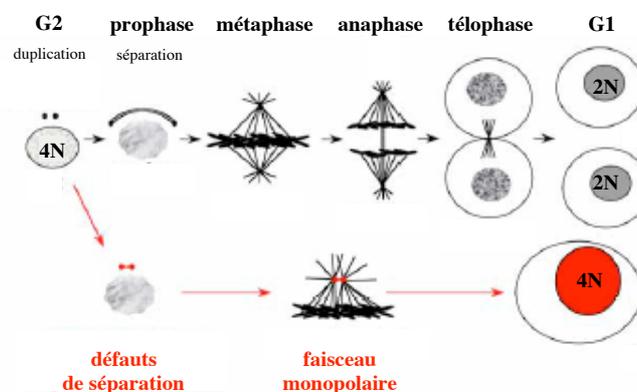
- Les spécificités de régulation par les protéine-phosphatases sont en accord avec des données d'interaction *in vivo*. D'après des études de coimmunoprécipitation, tandis qu'Aur-B interagit avec la PP1 et la PP2A, Aur-A n'interagit qu'avec la PP1 (Sugiyama *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 2001).

Chez les Mammifères, chacune des trois kinases assure des fonctions mitotiques différentes, illustrées par des localisations distinctes, mais toutes en relation directe avec le processus de ségrégation des chromosomes.

En raison du peu d'informations disponibles à ce sujet, nous n'aborderons pas le cas d'Aur-C, dont l'expression est très marquée dans le testicule. En effet, outre des résultats démontrant une localisation centrosomale de cette kinase en anaphase (Kimura *et al.*, 1999), suggérant une fonction relative à la nucléation des microtubules, seul un nombre très réduit d'études lui ont été consacrées.

## **B. Aurora-A**

Le gène *aurora-A* fut identifié chez l'Homme en 1997 à la suite d'une recherche d'homologie avec le gène *aur-A* de *D. melanogaster* (Kimura *et al.*, 1997a). La plupart des études menées chez divers organismes ont montré que la perturbation de la fonction Aur-A entraîne des anomalies centrosomales, notamment lors de la séparation des centrosomes dupliqués, menant de manière ultime à des phénomènes de polyploidie (fig. 14). Ce phénotype est confirmé par des études d'immunofluorescence démontrant une localisation constitutive d'Aur-A aux centrosomes (fig. 15).

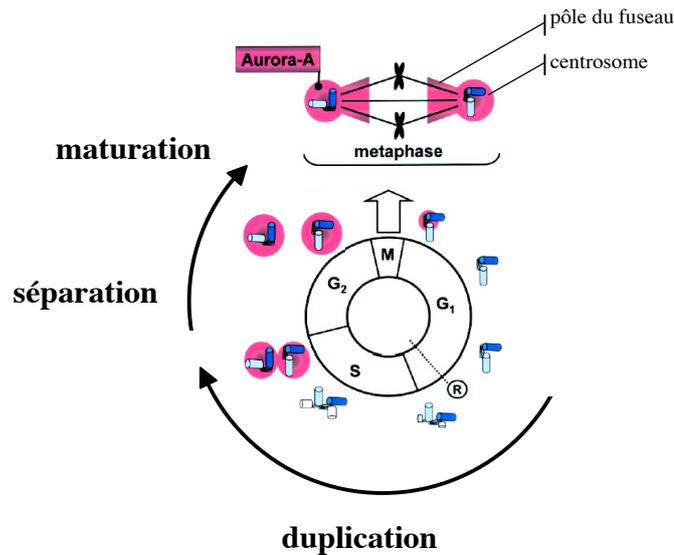


**Fig. 14: Implication d'Aur-A dans la séparation des centrosomes.** Lorsque la fonction Aur-A est affectée, les centrosomes ne se séparent pas. Le fuseau, monopolaire et circulaire, ne peut assurer la ségrégation des chromosomes, et il en résulte une cellule polyploïde et mononucléée (d'après Giet et Prigent, 1999).

### **1) Fonction d'Aur-A dans le cycle du centrosome**

Le centrosome, structure assurant la nucléation des microtubules, acteur primordial de la ségrégation des chromosomes, traverse tout au long du cycle cellulaire une série de processus qui visent à le préparer en vue de sa tâche mitotique, et qui ne sont pas sans rappeler le cycle de l'ADN (fig. 15) (Meraldi et Nigg, 2002).

Il y a d'abord la phase de duplication des centrioles, qui s'étend de la transition G1/S jusqu'à la fin de la phase S. Lors de la phase G2, les deux centrosomes se séparent, pour se positionner, lors de l'entrée en mitose, de part et d'autre du noyau. Plusieurs études montrent qu'Aur-A est impliquée dans chacune de ces deux étapes.



**Fig. 15: Le cycle du centrosome.** Aur-A est une kinase centrosomale. Lors de la métaphase, elle «*envahit*» les pôles du fuseau mitotique (d'après Dutertre *et al.*, 2002).

La surexpression ectopique d'un mutant inactif de la kinase Aur-A dans une lignée de cellules humaines entraîne une amplification des centrosomes (plus de deux centrosomes par cellule) (Meraldi *et al.*, 2002). La ségrégation, ainsi que la cytokinèse, ne peuvent avoir lieu, et la cellule devient dès lors polyploïde. L'une des hypothèses stipule que la kinase Aur-A, qui n'est présente aux centrosomes que lors de la fin de la duplication (fig. 15), inhiberait d'autres événements de duplication. La kinase Aur-A établirait ainsi un couplage entre le cycle du centrosome et le cycle cellulaire.

Aur-A est également impliquée dans l'étape de séparation des centrosomes. La mutation d'Aur-A chez *D. melanogaster* entraîne chez les embryons la formation d'un fuseau monopolaire, émanant d'une paire de centrosomes non séparés (Glover *et al.*, 1995). La ségrégation ne pouvant avoir lieu, la cellule devient polyploïde (fig. 14). L'identification du moteur moléculaire Eg5 de *X. laevis*, essentiel à la séparation des centrosomes, de localisation centrosomale, comme substrat d'Aur-A permet d'appréhender la cause de cette altération (Giet *et al.*, 1999). Bien qu'il n'existe pas de preuve formelle que cet événement de phosphorylation soit nécessaire, ou même lié, à la séparation des centrosomes, des expériences d'inhibition d'Eg5 ont montré que l'activité de cette protéine est nécessaire à ce processus (Blangy *et al.*, 1995).

Il semble donc qu'Aur-A soit l'un des principaux régulateurs du cycle centrosomal. Cependant, la perturbation de la fonction Aur-A a montré que cette kinase était également impliquée dans la régulation d'autres acteurs de la ségrégation des chromosomes.

## **2) Régulation par Aur-A de la dynamique du fuseau mitotique**

L'une des autres fonctions de la kinase Aur-A, permettant d'expliquer les défauts de ségrégation chez les mutants, est la régulation du fuseau mitotique. Il semblerait qu'Aur-A soit impliquée dans la nucléation des microtubules, mais également dans leur stabilisation.

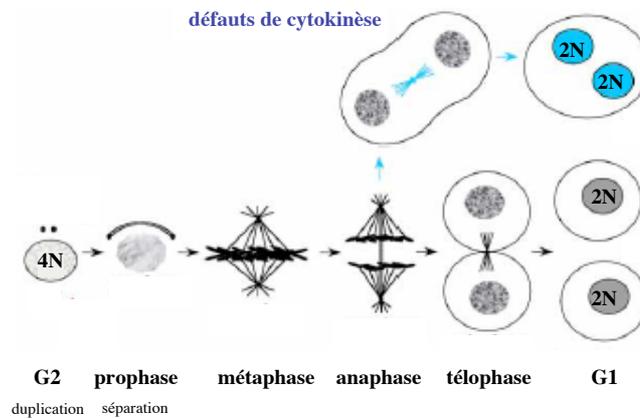
En prophase, une fois les centrosomes positionnés de part et d'autre du noyau, ils subissent l'étape de maturation, nécessaire à la formation d'un fuseau mitotique fonctionnel. Elle consiste en un recrutement de facteurs protéiques nécessaires à la nucléation des microtubules, l'un des mieux caractérisés étant la  $\alpha$ -tubuline. Il semble que la kinase Aur-A soit également impliquée dans cette étape. En effet, l'inactivation d'Aur-A chez *C. elegans* par la technique d' $\square$ RNA-interference  $\square$  entraîne une baisse du recrutement de la  $\alpha$ -tubuline au centrosome, se traduisant par la présence de quelques rares microtubules raccourcis (Hannak *et al.*, 2001).

Les altérations du fuseau mitotique constatées chez des mutants *aur-A* sont donc en partie liées à la fonction centrosomale de cette kinase. Cependant, Aur-A jouerait également un rôle plus direct dans la stabilisation du fuseau. Ainsi, l'addition dans un extrait d'œufs de *X. laevis* d'un mutant inactif de la kinase Aur-A entraîne la dépolymérisation des microtubules (Giet et Prigent, 2000). De manière analogue à la séparation des centrosomes, cette fonction dépend très probablement de la phosphorylation du moteur moléculaire Eg5, qui par ses activités de pontage inter-microtubules (Sharp *et al.*, 1999), est également impliqué dans la stabilité du fuseau (Sawin *et al.*, 1992).

### **C. Aurora-B**

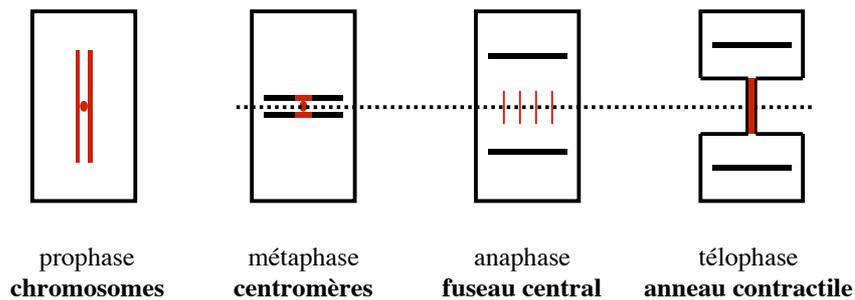
L'altération de la fonction Aur-B, entraîne comme celle d'Aur-A, la polypléidisation des cellules. Cependant, Aur-B jouant un rôle crucial dans la cytokinèse, processus de fin de mitose permettant l'individualisation des deux cellules-filles après la ségrégation de l'ADN,

le type de polyploïdie est différent de celui observé chez Aur-A: dans le cas d'Aur-B, les cellules sont polynucléées (fig. 16).

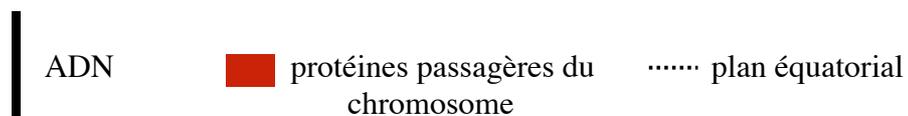


**Fig. 16: Implication d'Aur-B dans la cytokinèse.** Lorsque la fonction Aur-B est perturbée, il s'ensuit, outre des altérations de l'orientation des chromosomes en métaphase (non représentées ici), des défauts de cytokinèse, résultant en une cellule polyploïde et polynucléée (d'après Giet et Prigent, 1999).

À la différence d'Aur-A, Aur-B présente une localisation très dynamique tout au long de la mitose, et semble ainsi impliquée dans un grand nombre de processus mitotiques. Le profil de localisation d'Aur-B, que nous allons étudier, est caractéristique de la classe des «protéines passagères du chromosome» («chromosomal passenger proteins») (fig. 17), sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement. Nous allons procéder, à travers Aur-B, à l'étude de la localisation de ces protéines, illustrant à chaque fois la fonction jouée par cette kinase.



**légende**



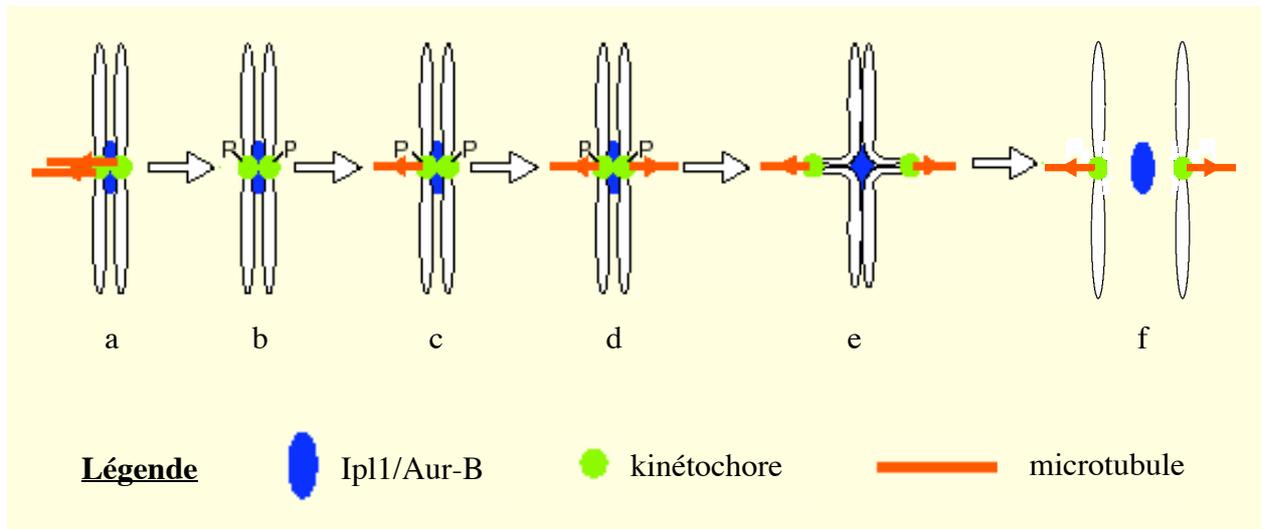
**Fig. 17: Localisation mitotique des protéines passagères du chromosome.**

Nous parlerons peu ici de la localisation chromatinienne d'Aur-B en phase G2 et en prophase, plus largement détaillée dans les parties « Résultats □ » et « Discussion □ ».

### **1) Rôle d'Aur-B dans l'orientation des kinétochores**

Dans une cellule de type sauvage, la transition métaphase-anaphase ne peut être franchie que lorsqu'une tension suffisante s'exerce sur le chromosome. Cette tension est la conséquence de la « Bi-orientation □ » du chromosome, c'est-à-dire de l'action de deux forces exercées par le fuseau mitotique, d'intensités égales mais opposées, dirigées chacune vers un pôle de la cellule. L'absence de tension, observée quand le chromosome est rattaché à un seul pôle (situation de « Mono-orientation □ »), active le point de contrôle du fuseau (« Spindle checkpoint □ ») (Millband *et al.*, 2002), qui à son tour inhibe la séparation des chromatides. Une fois les chromosomes correctement orientés, le point de contrôle du fuseau est désactivé et il y a séparation des chromatides. Ce mécanisme vise ainsi à prévenir tout risque de ségrégation aberrante des chromosomes.

Lors de la métaphase, Aur-B, ainsi que son homologue de levure Ipl1, sont localisés aux centromères, où elles jouent un rôle de premier plan dans la régulation du point de contrôle du fuseau. Bien qu'un tel mécanisme n'ait pas encore été mis en évidence chez les Mammifères, il semble qu'Ipl1 soit impliquée dans la correction d'appariements inappropriés. Il a en effet été montré que des kinétochores assemblés *in vitro* dans des extraits de mutants *ipl1* présentent une plus grande affinité pour les microtubules que ceux qui sont assemblés dans des extraits de cellules de type sauvage (Biggins *et al.*, 1999). De plus, tandis que chez une souche de type sauvage, les kinétochores mono-orientés se détachent d'un pôle, se rattachant à fréquences égales à celui-ci ou au pôle opposé, chez les mutants *ipl1*, les kinétochores restent attachés de façon stable à leur pôle (Tanaka *et al.*, 2002). Ipl1 favoriserait donc un « Turn-over □ » d'interaction kinétochores/microtubules, qui ne s'interromprait que lorsque le chromosome est bi-orienté (fig. 18).



**Fig. 18: Modèle d'action des kinases Ipl1 et Aur-B dans la régulation des interactions kinétochores/microtubules.** En cas de mono-orientation du chromosome (a), Ipl1/Aur-B phosphoryle des composants du kinétochore (b), favorisant ainsi un «turn-over» des microtubules (c, d). Une fois la bi-orientation obtenue, la tension exercée sur le chromosome favoriserait au centromère un changement de conformation, mettant le kinétochore hors de portée d'Ipl1 (e). Une fois tous les chromosomes sous tension, le point de contrôle du fuseau est inactivé. Il y a alors séparation, puis ségrégation des chromatides (f) (d'après Stern, 2002).

De plus, dans une souche mutante *ipl1*, ainsi que dans des cellules de *X. laevis* injectées avec un anticorps dirigé contre Aur-B, abolissant ainsi sa fonction, la mitose progresse jusqu'à son terme, suggérant ainsi une fonction dans l'établissement du point de contrôle du fuseau (Biggins et Murray, 2001 □ Kallio *et al.*, 2002). Cette hypothèse semble confirmée par le fait qu'en absence d'activité Aur-B, certains composants de ce mécanisme de surveillance ne sont pas recrutés par les kinétochores (Ditchfield *et al.*, 2003).

Aucun substrat kinétochorien de la protéine Aur-B de Mammifère n'a encore été identifié. Quant à Ipl1, bien qu'il soit désormais avéré qu'elle phosphoryle les protéines kinétochoriennes Ndc10 et Dam1 (Biggins *et al.*, 1999 □ Kang *et al.*, 2001), l'effet de ces événements sur l'interaction entre les kinétochores et les microtubules reste encore indéterminé. Il a cependant été proposé que ces modifications affaiblissent les interactions du kinétochore avec le fuseau (Shang *et al.*, 2003).

## **2) Rôle d'Aur-B dans la cytokinèse**

Une fois les chromatides ayant débuté leur migration vers les pôles, Aur-B se dirige vers le fuseau central, localisation qu'elle conservera jusqu'en fin de mitose (fig. 17).

Aur-B est impliquée dans la régulation de la dynamique du fuseau central, essentiel au processus de cytokinèse (Severson et Bowerman, 2002). En effet, plusieurs travaux ont montré que l'inhibition d'Aur-B entraîne une altération de ce processus : les deux cellules-filles ne sont pas séparées, expliquant ainsi le phénomène de polyploïdie (fig. 16) (Schumacher *et al.*, 1998b).

Il semblerait que chez *C. elegans*, Aur-B soit nécessaire au recrutement de la protéine Zen-4, homologue de la protéine MKLP-1 (« mammalian kinesin-like protein-1 ») de mammifère, avec laquelle elle interagit (Severson *et al.*, 2000). L'inactivation du gène *zen-4* entraîne, comme Aur-B, une absence de cytokinèse, qui se manifeste par l'apparition de cellules polyploïdes et polynucléées (Raich *et al.*, 1998). Cependant, aucun résultat ne permet encore d'affirmer que Zen-4 constitue réellement un substrat d'Aur-B.

Il semble qu'Aur-B agisse également sur l'activité d'autres moteurs moléculaires, comme la myosine II. Aur-B phosphoryle le résidu sérine 19 de sa sous-unité MRLC (« Myosin II regulatory light chain ») (Murata-hori *et al.*, 2000). Or, il a été montré que la transfection d'un gène codant pour MRLC et portant une mutation de ce résidu en alanine, non-phosphorylable, entraîne également des défauts de cytokinèse (Iwasaki *et al.*, 2001).

Ainsi, Aur-B, par la régulation de moteurs moléculaires, est nécessaire à l'organisation du fuseau central, élément crucial du processus de cytokinèse.

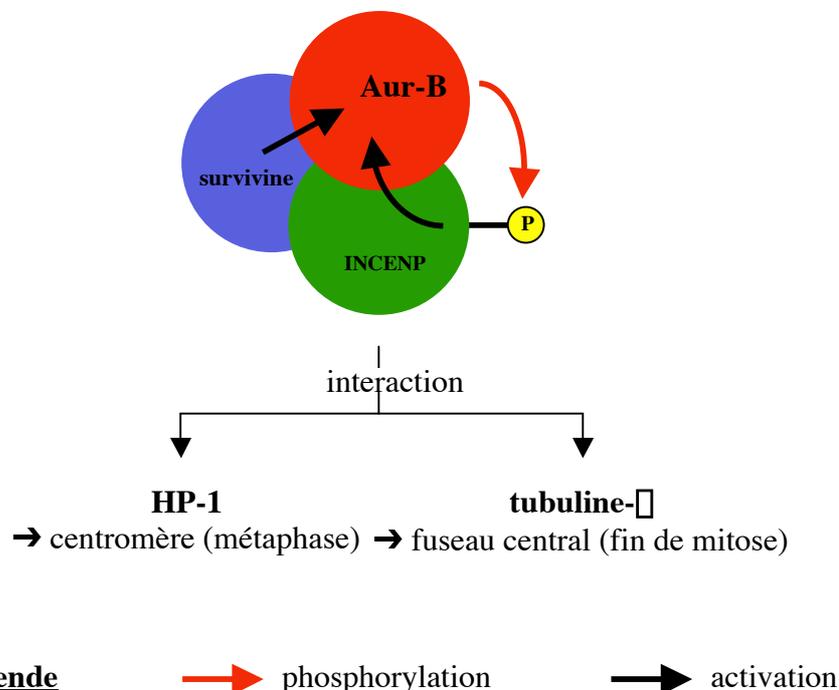
## **3) Les protéines passagères**

Le terme de « protéine passagère du chromosome » s'applique aux protéines présentant un profil de localisation identique à celui d'Aur-B (fig. 17) (Adams *et al.*, 2001). L'appellation de « passager du chromosome » décrit de manière imagée la relocalisation que ces protéines effectuent lors de la transition métaphase-anaphase, durant laquelle, tout en demeurant sur un plan équatorial, elles « descendent » du chromosome, comme les passagers d'un bus, tandis que les chromatides sont ségrégués vers les pôles.

Outre Aur-B, quatre d'entre elles ont jusqu'à présent été identifiées □ la survivine (Ambrosini *et al.*, 1997), INCENP (Cooke *et al.*, 1987), TD-60, relativement peu étudiée (Martineau-Thuillier *et al.*, 1998), et CSC-1, dont on ne sait si elle est présente chez d'autres

organismes que *C. elegans* (Romano *et al.*, 2003). INCENP, la survivine et CSC-1 sont, comme Aur-B, essentielles à la ségrégation des chromosomes ainsi qu'à la cytokinèse (Uren *et al.*, 2000; Romano *et al.*, 2003). À l'exception de TD-60, dont on ne connaît quasiment rien des relations avec les autres, Aur-B s'associe aux protéines passagères tout au long de la mitose en un complexe multiprotéique fréquemment désigné sous l'appellation de «complexe Aurora-B».

Chez les Mammifères, il a été montré que la localisation de chacune des sous-unités du complexe Aur-B/survivine/INCENP dépend des deux autres, mais également de l'activité d'Aur-B (Honda *et al.*, 2003). Ainsi, l'intégrité du complexe est nécessaire à sa localisation. De plus, chacune de ces trois protéines interagit physiquement avec les autres (Wheatley *et al.*, 2001a). Cependant, il semble que ce soit la protéine INCENP qui soit réellement chargée de l'ancrage du complexe: en effet, deux motifs situés dans la partie N-terminale d'INCENP sont respectivement nécessaires à sa localisation centromérique et à sa relocalisation vers le fuseau central (Ainsztein *et al.*, 1998). Tandis qu'aucune protéine fixant le premier de ces motifs n'a encore été identifiée, il semblerait que le second interagisse avec la tubuline- $\beta$ , composant majeur des microtubules (Wheatley *et al.*, 2001b) (fig. 19).



**Fig. 19: Régulation de l'activité d'Aur-B au sein du complexe Aur-B/survivine/INCENP.**

Non seulement cruciale à la localisation d'Aur-B, INCENP semble avoir un effet stimulateur sur l'activité kinase d'Aur-B. De plus, elle nécessiterait d'être phosphorylée par Aur-B, dont elle est un substrat physiologique, pour pouvoir ensuite l'activer (Bishop et Schumacher, 2002). Quant à la survivine, bien qu'elle ne semble pas phosphorylée par Aur-B, elle aurait également un effet stimulateur sur l'activité de cette kinase (Chen *et al.*, 2003).

Il reste encore beaucoup à apprendre sur la régulation de l'activité d'Aur-B, ainsi que sur la nature exacte des mécanismes moléculaires sous-jacents à son profil de localisation. Cependant, ces derniers résultats, relatifs aux relations existant entre Aur-B et les autres protéines passagères du chromosome, suggèrent qu'une grande partie de la fonction de cette kinase est sous le contrôle direct de ses partenaires d'interaction.

Il semble ainsi que les kinases Aurora régulent de nombreux protagonistes de la ségrégation des chromosomes : tandis qu'Aur-A est impliquée dans les processus mitotiques du centrosome, Aur-B est successivement impliquée dans l'orientation des chromosomes en métaphase et dans la cytokinèse en fin de mitose.

Peu avant le début de ma thèse en septembre 1999, le laboratoire du Dr Paolo Sassone-Corsi identifiait, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Allis, la kinase RSK2 comme phosphorylant la sérine 10 de l'histone H3 en réponse à une stimulation à l'EGF. Ces résultats avaient en partie été obtenus grâce à l'utilisation de cellules de patients atteints du syndrome de Coffin-Lowry, porteurs d'une mutation du gène RSK2. En effet, comme il a été détaillé dans l'introduction, ces cellules ne présentent pas de phosphorylation de l'histone H3, ni d'activation du gène *c-fos*. En revanche, il semblait inéluctable que RSK2 n'était pas impliquée dans la phosphorylation mitotique de l'histone H3, non perturbée chez ces patients.

Le laboratoire présentant un intérêt poussé pour les modifications de la chromatine, je tentai d'identifier la kinase mitotique de l'histone H3. La prochaine partie de ce manuscrit sera consacrée à l'exposé des résultats obtenus durant ma thèse.

Les techniques utilisées au cours de ma thèse sont détaillées dans la partie «**Matériels et méthodes**» de l'article exposé dans la partie «**Résultats**» de ce manuscrit.

D'autres techniques, spécifiques à l'étude de la phosphorylation des histones, et couramment utilisées au cours de ma thèse, ont fait l'objet d'une publication récente (Loury et Sassone-Corsi, 2003), dont le contenu est livré dans les pages suivantes.

*[signallement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

**Romain Loury**, and Paolo Sassone-Corsi

HISTONE PHOSPHORYLATION : HOW TO PROCEED.

**Methods 31 (2003), 40-48**

Pages 40-48 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

[http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00086-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00086-0)

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

Les résultats relatifs à l'identification d'Aur-B comme kinase mitotique de l'histone H3 ont fait l'objet d'une publication, dont le contenu est exposé dans les pages suivantes (Crosio *et al.*, 2002).

*[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]*

Claudia Crosio, Gian Maria Fimia, **Romain Loury**, Masashi Kimura, Yukio Okano, Hongyi Zhou, Subrata Sen, C. David Allis, and Paolo Sassone-Corsi

MITOTIC PHOSPHORYLATION OF HISTONE H3 : SPATIO-TEMPORAL REGULATION BY MAMMALIAN AURORA KINASES.

**Molecular and Cellular Biology 22 (2002), 874-885**

Pages 874-885 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://mcb.asm.org/cgi/reprint/22/3/874>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: [peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr](mailto:peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr).

### A. Analyse et discussion des résultats

Les résultats ci-dessus présentés nous permettent d'affirmer que, chez les Mammifères, la kinase Aur-B est directement responsable de la phosphorylation mitotique de l'histone H3. Plusieurs éléments nous confortent dans cette conclusion.

Grâce à des expériences d'immunofluorescence, nous avons mis en évidence une corrélation spatio-temporelle parfaite entre la localisation d'Aur-B et la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3. Tout d'abord, lors de l'initiation de la condensation en fin de phase G2, Aur-B est présente uniquement dans l'hétérochromatine péricentrique, ainsi que la phosphorylation de l'histone H3. Durant la prophase, la phosphorylation s'étend aux bras du chromosome, comme que la distribution d'Aur-B. Ce n'est que lorsque la condensation de la chromatine et la phosphorylation de l'histone H3 ont atteint leur niveau maximal, en métaphase, qu'Aur-B se concentre aux centromères, où elle régule l'orientation des kinétochores, processus également crucial à la ségrégation des chromosomes.

Quant aux expériences de «GST-pulldown», elles révèlent une interaction entre la kinase Aur-B et l'histone H3. Il avait été précédemment décrit que l'activité kinase de l'histone H3 en mitose, dont l'identité était alors inconnue, pouvait interagir avec la queue de l'histone H3, tandis que la mutation de la sérine 10 en alanine abolissait cette interaction (de la Barre *et al.*, 2000). Nos résultats ne semblent pas s'accorder avec ces affirmations. D'après nos travaux, l'interaction d'Aur-B n'est pas affectée par cette mutation. D'autre part, il semblerait qu'Aur-B soit sensible à la présence de résidus basiques dans le voisinage du résidu ciblé (Sugiyama *et al.*, 2002), ce qui serait en totale adéquation avec le modèle couramment admis, favorisant le rôle de l'environnement peptidique dans la spécificité de reconnaissance d'un substrat par son enzyme.

Bien qu'à un niveau plus faible, ces tests d'interaction semblent également suggérer une affinité d'Aur-B pour l'histone H4. Cette interaction ne semble toutefois pas témoigner de l'existence d'une relation enzyme-substrat, car d'après nos tests kinase *in vitro*, l'histone H4 n'est pas phosphorylée par Aur-B. Les interactions avec des composants de la chromatine ne devant être appréhendés que dans un contexte nucléosomal, il est probable que la kinase Aur-B nécessite la présence d'autres déterminants peptidiques, présents au sein d'autres queues d'histones, pour reconnaître et phosphoryler l'histone H3.

Des études récentes portant sur la régulation des kinases Aurora projettent un jour nouveau sur nos résultats de phosphorylation *in vitro*. Nos travaux montrent qu'Aur-A phosphoryle également la sérine 10 de l'histone H3, et de manière surprenante au premier

abord, avec une efficacité supérieure à Aur-B. Cependant, Aur-A n'étant jamais, d'après nos résultats d'immunofluorescence, de localisation chromatinienne, il est difficile d'imaginer qu'elle puisse jouer un rôle direct dans la phosphorylation mitotique de l'histone H3. De plus, tandis qu'il n'existe que peu de données relatives à la régulation de l'activité d'Aur-B par phosphorylation, il semble avéré que la kinase Aur-A s'autophosphoryle *in vivo* sur la thréonine 288, stimulant ainsi son activité enzymatique (Eyers *et al.*, 2003). Quant à Aur-B, si elle contient l'équivalent de ce résidu au sein d'une boucle d'activation conservée, aucune étude n'a encore apporté d'indices concernant un quelconque événement d'autophosphorylation. De plus, nos expériences de tests kinase avec des protéines Aurora, recombinantes ou immunoprécipitées d'un extrait cellulaire, montrent que l'autophosphorylation, également constatée chez Aur-B, est beaucoup plus marquée chez Aur-A. Ainsi, les différences de niveau de phosphorylation de l'histone H3 observées ne pourraient refléter que des spécificités d'activation entre les kinases Aurora.

Tandis que nos résultats démontrent l'implication d'Aur-B dans la phosphorylation mitotique de l'histone H3 chez les mammifères, d'autres auteurs sont parvenus à des conclusions similaires chez d'autres espèces, confirmant ainsi la conservation des mécanismes de ségrégation de l'ADN au cours de l'évolution. Parmi ces espèces, on dénombre les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* (Hsu *et al.*, 2000 ; Petersen *et al.*, 2001), chez lesquelles leurs kinases respectives Ipl1 et Ark1, uniques membres de la famille Aurora chez ces organismes, sont responsables de cette modification.

Chez *C. elegans* et *D. melanogaster*, espèces ne comportant que les kinases Aur-A et Aur-B, mais pas Aur-C, c'est également Aur-B qui a été impliquée dans la phosphorylation mitotique de l'histone H3. De plus, l'invalidation du gène Aur-B par la technique de l'ARN-interférence entraîne, outre des défauts de cytokinèse, l'abolition de la phosphorylation mitotique de l'histone H3 (Hsu *et al.*, 2000 ; Giet et Glover, 2001).

### **B. D'autres kinases mitotiques pour l'histone H3?**

Aur-B semble ainsi responsable de la phosphorylation mitotique de l'histone H3. Cependant, d'autres travaux soulèvent l'hypothèse de l'existence d'autres kinases mitotiques pour l'histone H3. L'hypothèse d'une participation collective de plusieurs kinases à ce

processus a maintes fois été soulevée. Plusieurs d'entre elles ont ainsi été pressenties pour ce rôle.

### **1) La kinase Aur-A chez *X. laevis***

Ces résultats, reposant en grande partie sur des résultats de tests kinase menés *in vitro*, démontrent la spécificité de phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 par la kinase Aur-A, également vérifiée par nos travaux (Scrittore *et al.*, 2001). Les auteurs décrivent l'association de la kinase Aur-A de *X. laevis* avec la chromatine en cours de condensation. Cette dernière affirmation est en contradiction avec nos résultats, ainsi qu'avec la plupart des études relatives à la localisation mitotique d'Aur-A (Sugimoto *et al.*, 2002). De plus, l'immunodéplétion de la kinase Aur-A n'entraîne aucune altération détectable de la phosphorylation de l'histone H3 ou de l'état de compaction de l'ADN, résultat attribué par les auteurs à une redondance fonctionnelle d'Aur-A avec d'autres kinases mitotiques de l'histone H3. Bien que l'hypothèse de la participation de plusieurs kinases à la phosphorylation de l'histone H3 soit plausible, il est cependant peu vraisemblable qu'Aur-A constitue l'une d'entre elles.

### **2) La kinase PAK-1 chez *H. sapiens***

D'autres auteurs ont suggéré une implication de la kinase PAK-1 («p21-activated kinase-1») dans la phosphorylation mitotique de l'histone H3 (Li *et al.*, 2002). Ces travaux montrent en effet que PAK-1 peut phosphoryler de manière spécifique la sérine 10 de l'histone H3, avec laquelle, d'après des expériences de GST-pulldown, elle interagirait. Cependant, aucune des expériences d'immunofluorescence présentées dans cet article ne démontre véritablement une colocalisation de PAK-1 avec la phosphorylation de l'histone H3. À l'exception d'une localisation centromérique en métaphase, accompagnée de rares foci ponctuels sur les bras de quelques chromosomes, l'association de cette kinase avec les centrosomes semble prévaloir durant toute la mitose. De manière analogue à Aur-B, PAK-1 est localisée sur l'anneau contractile en fin de mitose. Ces résultats confirment que la kinase PAK-1 joue très probablement un rôle important dans la ségrégation des chromosomes. Le profil de localisation observé par les auteurs reflète des rôles déjà décrits précédemment, notamment dans la régulation du cycle centrosomal (Vadlamudi *et al.*, 2000) et dans la cytokinèse (Chung et Firtel, 1999).

Quant aux tests kinase, ils pourraient refléter un aspect enzymatique non corrélé à une réelle fonction physiologique□ il a été démontré que, comme Aur-B, la kinase PAK-2 phosphoryle la sérine 19 de la sous-unité MRLC de la myosine II (Chew *et al.*, 1998□Muratahori *et al.*, 2000). Il semblerait donc que les kinases PAKs et les kinases Aurora présentent des spécificités de substrat assez voisines, expliquant ainsi la phosphorylation de l’histone H3 par PAK-1 *in vitro*. Ainsi, ces résultats, bien qu’ils tendent à confirmer le rôle crucial des kinases PAKs dans la mitose, n’apportent pas de preuve irréfutable quant à l’implication de la kinase PAK-1 dans la phosphorylation mitotique de l’histone H3.

### **3) La kinase NIMA chez *A. nidulans***

NIMA est le membre fondateur d’une famille de kinases mitotiques, comprenant plusieurs homologues, les kinases nek, chez les mammifères (Lu et Hunter, 1995). Il semble que chez un mutant nimA («never in mitosis A») d’*A. nidulans*, la phosphorylation de l’histone H3 soit abolie (De Souza *et al.*, 2000). De plus, NIMA peut phosphoryler de manière spécifique la sérine 10 de l’histone H3 *in vitro*. Malgré la mise en évidence de la localisation chromatinienne de NIMA en prophase, les auteurs de cette étude ne parviennent pas à démontrer une réelle dynamique de leur kinase candidate au cours de la condensation, contrairement à nos travaux qui soulignent une stricte corrélation entre la phosphorylation de l’histone H3 et la localisation d’Aur-B, et ceci à trois stades successifs de condensation (G2, prophase, métaphase).

Ces résultats montrent toutefois que, chez *A. nidulans*, la phosphorylation mitotique de l’histone H3 est sous la dépendance de la kinase NIMA. Si l’on en juge d’après la conservation au cours de l’évolution du rôle d’Aur-B dans la phosphorylation de l’histone H3, il est tentant d’extrapoler, par analogie, sur le rôle des kinases nek chez les mammifères. Il semblerait que certains membres de cette famille, dont nek2, soient associés aux chromosomes lors de la phase de condensation (Ha Kim *et al.*, 2002), mais aucune donnée relative à la régulation de la phosphorylation de l’histone H3 par les kinases nek de mammifère n’est encore disponible.

Ainsi, s’il semble que la kinase NIMA, et peut-être certains de ses homologues chez les mammifères, jouent un rôle important dans la phosphorylation de l’histone H3, il reste à déterminer s’il s’agit d’une relation directe d’enzyme à substrat, suggérant la participation de plusieurs kinases à la phosphorylation mitotique de l’histone H3, ou si NIMA se situe plus en amont dans une cascade de transduction régulant cette modification.

### **C. Rôle de la kinase Aurora-B dans la condensation**

Depuis la publication des travaux relatifs à la régulation de la phosphorylation mitotique de l'histone H3 par Aur-B, d'autres études ont démontré le rôle de la kinase Aur-B dans d'autres événements liés à la condensation des chromosomes. Cette enzyme semble non seulement liée à des modifications de la chromatine, mais également à des processus impliquant les facteurs de condensation des chromosomes.

#### **1) Aur-B et les modifications mitotiques de la chromatine**

De manière additionnelle à la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3, d'autres résidus d'histones semblent être modifiés par la kinase Aur-B. C'est ainsi le cas des phosphorylations de la sérine 28 de l'histone H3 et de la sérine 7 du variant centromérique de celle-ci, CENP-A (Goto *et al.*, 2002; Zeitlin *et al.*, 2001b). Il est à noter que ces résidus présentent un environnement peptidique similaire (ARKS) à celui de la sérine 10 de l'histone H3.

Aucune étude n'a encore permis d'élucider le rôle exact de la phosphorylation de la sérine 28. Cependant, il semble qu'elle soit également liée au processus de condensation des chromosomes, car ses caractéristiques spatio-temporelles sont similaires à celles de la sérine 10 (Goto *et al.*, 1999). Il pourrait s'agir d'une modification présentant un certain degré de redondance avec la phosphorylation de la sérine 10.

La phosphorylation de la sérine 7 de CENP-A, forcément restreinte au centromère, n'est détectable qu'en fin de prophase, atteint un niveau maximal en métaphase et décroît rapidement en anaphase (Zeitlin *et al.*, 2001a). La localisation de cette modification semblerait suggérer qu'elle est impliquée dans le processus de cohésion. Or, après mutation de ce résidu en alanine, la perte de cohésion s'effectue de manière appropriée. En revanche, la localisation d'Aur-B est altérée: lors de l'anaphase, elle ne se relocalise pas vers le fuseau central, et regagne avec beaucoup de retard l'anneau contractile en fin de mitose. Cette perturbation de la fonction des protéines passagères se traduit par un retard de cytokinèse. Ainsi, Aur-B contrôlerait elle-même en partie son profil de localisation, utilisant la chromatine comme support de cette régulation.

## **2) Aur-B et les facteurs protéiques impliqués dans la condensation**

Outre son rôle dans la modification mitotique des queues d'histones, Aur-B a également été corrélée à d'autres phénomènes associés à la condensation des chromosomes. Malgré quelques différences liées à l'espèce et au type d'approche utilisée, il semble qu'Aur-B puisse intervenir à différents niveaux du processus de condensation.

### **a) Aur-B et le complexe condensine**

Chez *D. melanogaster*, suite à l'inactivation par «ARN-interférence» du gène Aur-B, le complexe de la condensine, crucial à la condensation, n'est pas recruté par les chromosomes, mettant ainsi en lumière l'une des causes potentielles de l'altération de la condensation (Giet et Glover, 2001). Cette relation de dépendance de la condensine vis-à-vis d'Aur-B a également été décrite chez *C. elegans* et *S. pombe* (Hagstrom *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2001). Aucune étude ne permet pour l'instant d'affirmer si le complexe de la condensine constitue un substrat d'Aur-B, ou s'il s'agit d'un mécanisme de régulation plus indirect.

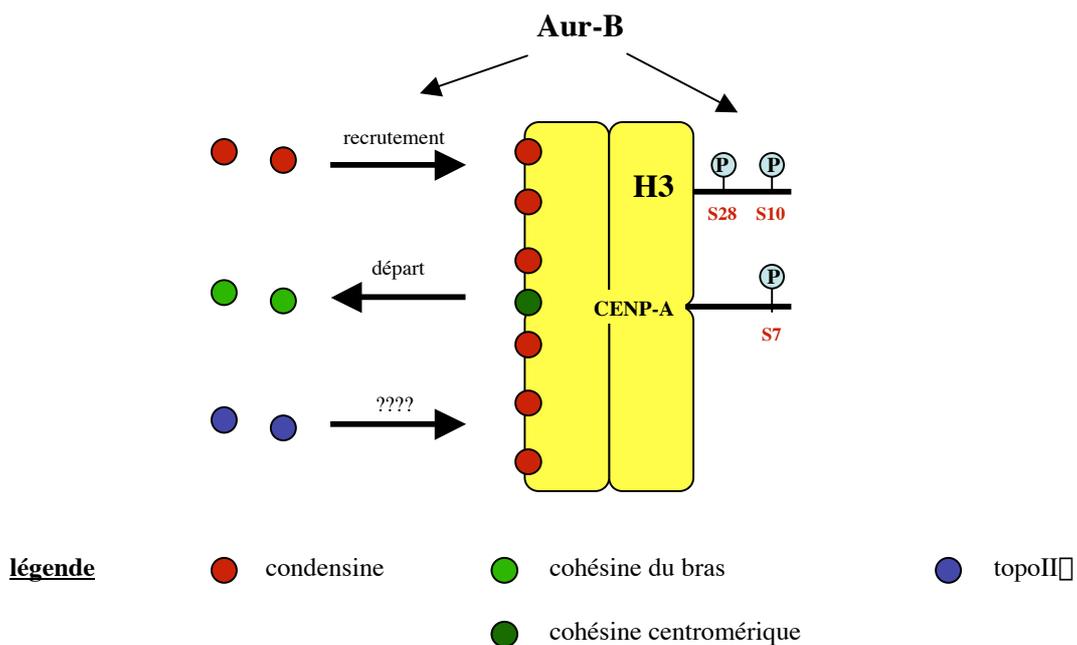
L'apparition de la condensine sur les chromosomes s'effectuant de manière coordonnée à la phosphorylation de l'histone H3, il a été proposé que cette modification constitue un point d'ancrage pour la condensine sur l'ADN (Wei *et al.*, 1999). Cependant, même si certains auteurs ont fait état d'une interaction entre la condensine et la queue de l'histone H3, il semblerait qu'elle soit indépendante du statut de phosphorylation (Schmiesing *et al.*, 2000; Ball, *et al.*, 2002). Bien que la condensine semble être sous le contrôle d'Aur-B, les mécanismes de son recrutement sur la chromatine mitotique ne sont donc toujours pas élucidés.

### **b) Aur-B et le complexe cohésine**

Ainsi qu'il a été exposé dans la partie d'introduction, 95% du complexe de la cohésine, nécessaire à la cohésion interchromatides, se dissocie de la chromatine en prophase (fig. 10) (Sumara *et al.*, 2000). Dans un extrait d'œuf de *X. laevis*, système fréquemment utilisé dans l'étude de la condensation des chromosomes, l'immuno-déplétion d'Aur-B interfère avec cette phase (Losada *et al.*, 2002). Il semblerait donc qu'Aur-B soit impliquée dans la perte de cohésion interchromatides observée en début de mitose.

### c) Aur-B et la topoisomérase II

Lorsqu'Aur-B est immuno-déplétée d'un extrait d'oeuf de *X. laevis*, les chromatides paraissent moins individualisées, ce qui suggère l'idée qu'Aur-B puisse être requise pour leur résolution (Losada *et al.*, 2002). Au cours de chaque processus cellulaire lié à l'ADN, comme la transcription et la réplication, la classe des topoisomérases est responsable de la résolution de l'entremêlement des brins d'ADN entre eux (Wang, 2002). Lors de la condensation de l'ADN, de tels problèmes topologiques sont résolus par la topoisomérase II (Christensen *et al.*, 2002). Or, après incubation de chromosomes en présence d'une kinase recombinante Aur-B et d'ATP marqué au  $^{32}\text{P}$ , puis micro-séquençage des bandes radioactives, il semblerait que la topoisomérase II soit un substrat d'Aur-B (Morrison *et al.*, 2002). Bien que l'effet exact de cet événement de phosphorylation ne soit pas connu, il est fort probable qu'il soit de grande importance dans l'activité de cette enzyme.



**Fig. 20: Mode d'action d'Aur-B dans la condensation des chromosomes.**

### 3) Quels sont les mécanismes de régulation d'Aur-B

Si ce n'est quelques résultats concernant l'effet activateur des protéines passagères, et notamment d'INCENP, sur Aur-B, notre compréhension des mécanismes de régulation de

cette kinase est encore très fragmentaire. Comme un grand nombre de kinases, son activité est régulée par des évènements de phosphorylation/déphosphorylation, mais la nature des résidus affectés nous est encore inconnue (Sugiyama *et al.*, 2002). De même, aucune étude permettant d'identifier des kinases situées en amont d'Aur-B n'a encore été menée. Cependant, après étude de résultats relatifs à la régulation de la condensation des chromosomes, certaines hypothèses peuvent être posées.

La cascade de transduction Ras/MAPK est l'une des voies de transduction les plus étudiées. Souvent impliquée dans la signalisation des stimuli de prolifération, plusieurs travaux semblent démontrer l'existence d'un rôle mitotique pour ces kinases, et d'après certains éléments que nous allons exposer ci-dessous, il n'est pas exclu qu'elles puissent en partie assurer la régulation d'Aur-B

- Lors de la maturation d'oocytes de *X. laevis*, il semblerait que la phosphorylation de l'histone H3 soit sous le contrôle de la voie MAPK (Schmitt *et al.*, 2002). Les oocytes immatures de *X. laevis* sont bloqués en prophase de première division méiotique. Un traitement à la progestérone entraîne la progression des cellules en méiose, processus de maturation placé sous le contrôle de la voie de transduction MAPK, ainsi que du facteur MPF. Une fois parvenues en métaphase de la deuxième division méiotique, elles subissent un second arrêt, qui ne sera levé que suite à la fertilisation.

Tandis qu'avant la maturation, la phosphorylation de l'histone H3 est quasi-indétectable, la maturation entraîne son apparition dès l'entrée en première division méiotique. L'inactivation de la voie MAPK, par traitement avec l'inhibiteur spécifique U0126, abolit toute phosphorylation de l'histone H3 lors de la maturation, tandis que l'activité du facteur MPF ne semble pas affectée. Ainsi, il semblerait que, du moins dans certains systèmes, la phosphorylation de l'histone H3 soit sous la dépendance des voies de transduction MAPK.

- Il semblerait de plus que, lors de la mitose, certains composants de la voie des MAPKs colocalisent avec Aur-B. D'après des expériences d'immunofluorescence menées avec un anticorps dirigé contre les formes actives (diphosphorylées) d'ERK1 et ERK2, ces kinases, situées le plus en aval dans cette cascade de transduction, sont présentes sur les kinétochores des cellules en métaphase, ainsi que sur l'anneau contractile de la phase de cytokinèse, localisations partagées par la kinase Aur-B (Zecevic *et al.*, 1998).

Ces éléments semblent favoriser une régulation de la kinase Aur-B par la voie des MAP kinases. Afin de vérifier cette proposition, il serait intéressant d'étudier l'effet provoqué

dans des cellules de mammifère par des inhibiteurs spécifiques à cette voie de transduction non seulement sur la phosphorylation mitotique de l'histone H3, mais également sur l'activité et la localisation d'Aur-B.

### **D. Le rôle de la phosphorylation mitotique de l'histone H3**

Ainsi qu'il a été exposé dans la partie d'introduction, la fonction exacte de la phosphorylation de l'histone H3 n'est toujours pas élucidée. Les deux hypothèses majeures reflètent chacune un mécanisme potentiel de régulation cellulaire par les modifications de la chromatine.

#### **1) Un rôle effecteur**

L'hypothèse soulevée par les travaux de mutation de la sérine 10 en alanine chez *T. thermophila* stipule que la phosphorylation de l'histone H3 serait essentielle à la condensation des chromosomes (Wei *et al.*, 1999). Elle confère ainsi à cette modification un rôle d'effecteur direct de la condensation. Cependant, deux éléments semblent contredire ce modèle

- la même mutation de la sérine 10 en alanine n'entraîne aucun effet détectable lors de la mitose et de la méiose chez *S. cerevisiae* (Hsu *et al.*, 2000). Ce résultat semblerait signifier que cette modification n'est pas essentielle à la condensation chez la levure. Cependant, en raison de la complexité du «code histone», il est difficile d'affirmer d'après ces derniers résultats que la phosphorylation de la sérine 10 n'est pas impliquée dans la dynamique mitotique de l'ADN. Les différences de phénotype observées sont peut-être uniquement dues à l'existence, chez des espèces plus évoluées, de modifications offrant une redondance fonctionnelle avec la phosphorylation de la sérine 10, dont l'absence serait alors sans conséquences.

- d'après l'hypothèse du «code histone», toute modification des queues d'histones serait «décodée» grâce à l'interaction de facteurs protéiques responsables d'une altération de l'état de compaction de la chromatine. C'est ainsi qu'il a été suggéré que la phosphorylation mitotique de l'histone H3 constituerait un point d'ancrage pour les facteurs de condensation des chromosomes (Wei *et al.*, 1999). Cependant, jusqu'à présent, aucun facteur de condensation connu ne semble interagir avec la queue de l'histone H3 autrement que de

manière indépendante de son état de phosphorylation (Schmiesing *et al.*, 2000; Ball, *et al.*, 2002).

D'autres auteurs ont proposé un mécanisme de couplage plus indirect entre la phosphorylation de l'histone H3 et le recrutement de la condensine : après immuno-déplétion de la kinase Aur-B d'un extrait de *X. laevis*, la cohésine ne serait pas écartée des chromosomes (Losada *et al.*, 2002). Les auteurs de ces travaux proposent que la phosphorylation mitotique de l'histone H3 ne serait pas directement responsable du recrutement de la condensine, mais permettrait au contraire le départ de la cohésine des bras du chromosome lors de la prophase. Ainsi, celui-ci déplacé, la condensine pourrait alors interagir avec la chromatine, favorisant la condensation des chromosomes.

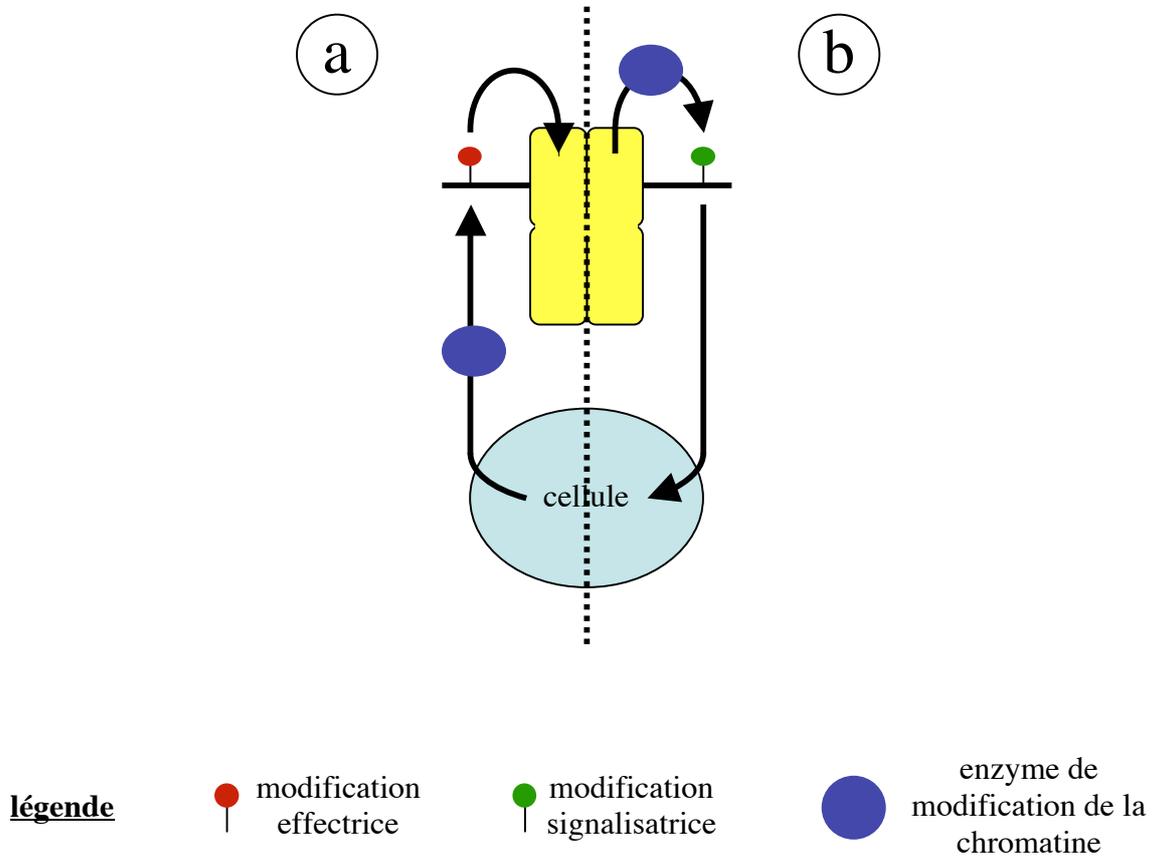
## **2) Un rôle signalisateur**

Suite à l'observation du motif de localisation de la phosphorylation de l'histone H3 lors de la mitose et de la méiose chez les plantes (fig. 12) (Kaszas et Cande, 2000), d'autres auteurs proposèrent un rôle différent pour la phosphorylation mitotique de l'histone H3. Cette hypothèse, dite du «ready production label» (cf p. 33), stipule que cette modification n'est pas directement impliquée dans la dynamique de l'ADN en mitose, mais en serait au contraire une conséquence. Elle permettrait de renseigner la cellule sur l'état de compaction de la chromatine, afin qu'elle ne s'engage pas dans le processus de séparation des chromatides avant que celles-ci soient totalement condensées. Ainsi, au lieu d'un rôle effecteur, cette hypothèse confère à la phosphorylation mitotique de l'histone H3 une fonction signalisatrice.

Il s'agirait d'un concept nouveau dans l'étude des modifications d'histones. D'autres modifications de la chromatine semblent assurer une telle fonction. C'est ainsi le cas de la phosphorylation mitotique de la sérine 7 de CENP-A, catalysée par Aur-B (Zeitlin *et al.*, 2001b). La mutation de ce résidu entraîne une perturbation de la cytokinèse, mais aucun défaut de condensation ou de cohésion. Cette modification permettrait ainsi le contrôle d'évènements ayant lieu plus tardivement lors de la mitose, et n'aurait aucun effet direct sur la dynamique mitotique de l'ADN.

L'exemple de CENP-A, ainsi que, si elle est confirmée, l'hypothèse du «ready production label», constituerait un tournant dans l'étude des modifications d'histones. Il y aurait d'une part des modifications effectrices, responsables d'un changement d'état de

compaction de la chromatine, et d'autre part des modifications signalisatrices, chargées de renseigner la cellule, afin que celle-ci puisse proposer une réponse appropriée.



**Fig. 21: Deux types de modifications d'histones** a) la cellule informe la chromatine d'un changement de contexte cellulaire. La chromatine adapte son état de compaction en conséquence la modification est effectrice (hypothèse de la condensation) b) la chromatine informe la cellule de son état de compaction. La cellule apporte une réponse appropriée la modification est signalisatrice (hypothèse du «ready production label»).

### ***E. Les modifications mitotiques de la chromatine***

Afin d'appréhender le rôle de la phosphorylation mitotique de l'histone H3, il sera utile de la considérer comme un élément parmi d'autres, dans un ensemble de modifications mitotiques de la chromatine.

## **1) L'hyperphosphorylation mitotique de l'histone H1**

Longtemps considérée à tort comme l'une des causes principales de la condensation des chromosomes (Bradbury, 1992; Roth et Allis, 1992), le rôle exact de l'hyperphosphorylation de l'histone H1 n'est toujours pas élucidé. D'après plusieurs études, il semblerait d'assez faible importance. En effet, la condensation peut avoir lieu en absence de l'histone H1, *in vitro* et *in vivo* (Shen *et al.*, 1995; Ohsumi *et al.*, 1993).

Quant aux travaux ayant conclu à la non-essentialité de la phosphorylation d'H1 (Guo *et al.*, 1995), il est nécessaire de préciser que les auteurs n'ont pas utilisé comme modèle d'étude une mitose physiologique, mais le phénomène de «condensation prématurée des chromosomes». Celui-ci s'obtient par traitement des cellules avec certains inhibiteurs de phosphatases, comme l'acide okadaïque, ou la fostriecine. Il y a alors condensation des chromosomes, s'accompagnant de certains phénomènes mitotiques. C'est à la suite de ce traitement que ces auteurs ont découvert que tandis que l'histone H3 était phosphorylée, l'histone H1 ne l'était pas. Ils en ont conclu que la phosphorylation de l'histone H1 n'était pas nécessaire à la condensation mitotique. Cependant, la réelle nature mitotique de cette condensation prématurée des chromosomes est discutable, car si elle est trop prolongée, elle mène les cellules en apoptose. Ainsi, à notre connaissance, la preuve de la non-essentialité de la phosphorylation de l'histone H1 dans un contexte strictement mitotique n'a pas été apportée.

D'après plusieurs travaux, il est possible de suggérer un rôle pour cet événement. La phosphorylation de l'histone H1 entraîne une baisse d'affinité pour l'ADN *in vitro* (Hill *et al.*, 1991). De plus, il a été montré que la phosphorylation de l'histone H3 est fortement inhibée *in vitro* par l'addition d'histone H1 interphasique, effet grandement réduit lorsque l'histone H1 est d'origine mitotique, c'est à dire hyperphosphorylée (Shibata et Ajiro, 1993). La juxtaposition de ces deux résultats peut suggérer l'idée selon laquelle l'hyperphosphorylation, provoquant une baisse d'affinité de l'histone H1 pour la chromatine, permettrait l'accessibilité des enzymes de modification aux queues d'histones. La phosphorylation de l'histone H1 constituerait alors une condition préalable à la modification d'autres histones. De plus, cette hypothèse serait en accord avec le fait que la condensation puisse ne pas être affectée, *in vitro* comme *in vivo*, par l'absence d'histone H1, car selon cette hypothèse, son absence équivaldrait, dans le contexte de la condensation, à son hyperphosphorylation.

Il s'agit cependant de données obtenues à la suite d'expériences menées *in vitro*, et une telle hypothèse nécessiterait une confirmation *in vivo*. Ainsi qu'il a été exposé dans la partie

d'introduction, le lien entre condensation et phosphorylation de l'histone H3 a été établi chez *T. thermophila* par des études de mutation du résidu sérine 10 en alanine (Wei *et al.*, 1999). Il serait intéressant de créer de telles mutations dans l'histone H1 de cet organisme, et d'en étudier les effets, non seulement sur la condensation, mais également sur l'occurrence d'autres modifications d'histones, dont la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3.

## **2) D'autres modifications mitotiques de la chromatine**

Bien que l'étude des modifications mitotiques d'histones ait surtout concerné la phosphorylation, d'autres modifications, notamment de méthylation, semblent jouer un rôle de premier plan dans la dynamique mitotique de l'ADN.

Il semblerait que l'histone H4 soit méthylée sur la lysine 20, et ceci de manière spécifique à la mitose (Rice *et al.*, 2002). L'enzyme impliquée serait la HMT Pr-Set7, dont l'abondance est également maximale en mitose. Cette modification présente un profil spatio-temporel similaire à la phosphorylation de la sérine 7 de CENP-A. Elle est initiée en fin de prophase et ne concerne que l'hétérochromatine péricentrique. Elle décroît en fin de mitose, tout en restant à des niveaux assez élevés en interphase. Le rôle mitotique de cette modification n'a pas encore été élucidé.

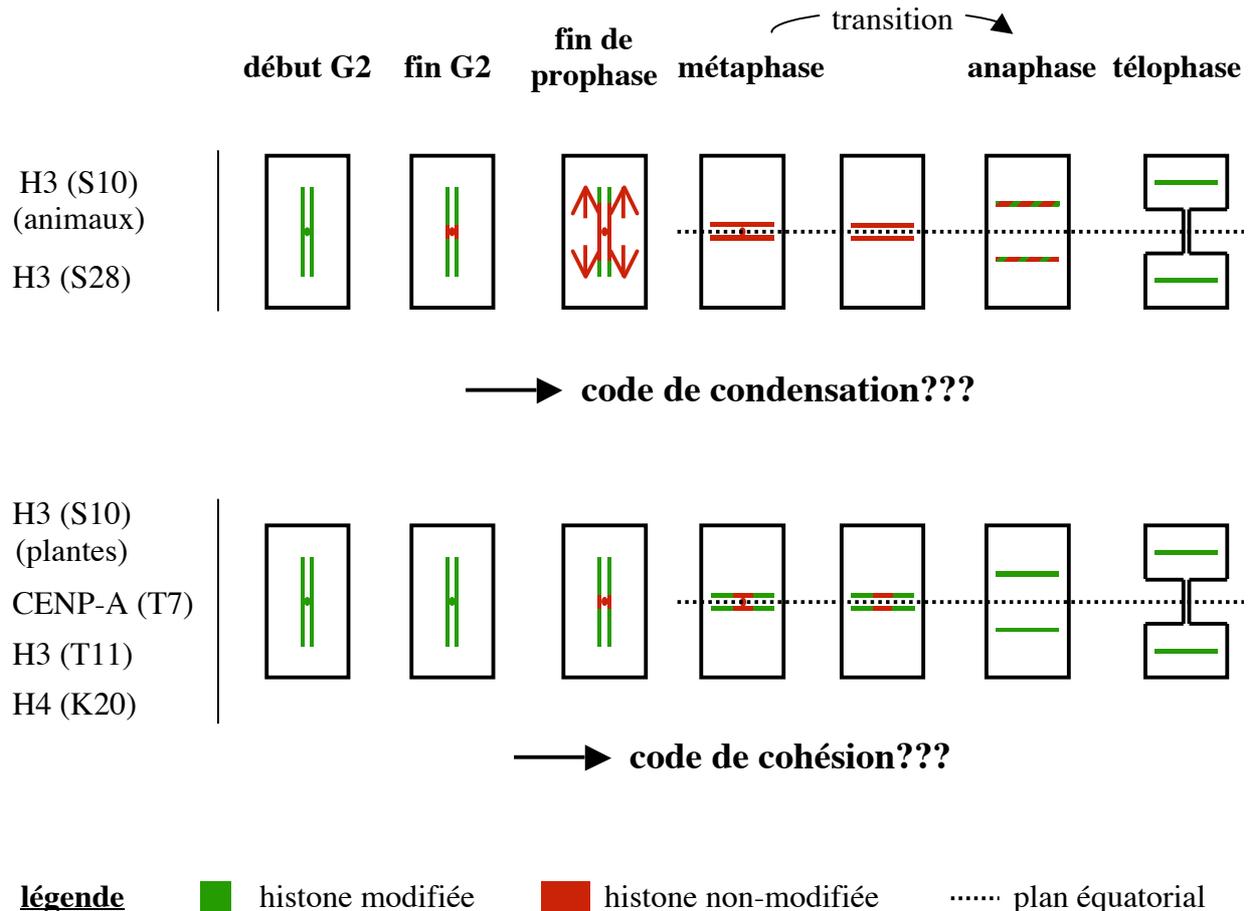
D'autres évènements de méthylation pourraient également jouer un rôle durant la mitose. Il a été découvert que la protéine HP-1, impliquée dans la formation d'hétérochromatine, interagit avec la sous-unité Scc1 du complexe de la cohésine (Nonaka *et al.*, 2002). Or, HP-1 est ancré à la chromatine grâce à une interaction spécifique avec l'histone H3 méthylée sur le résidu lysine 9 (Bannister *et al.*, 2001; Lachner *et al.*, 2001). S'il s'avère que la localisation de la méthylation de la lysine 9 sur le chromosome coïncide avec celle de la cohésine, il pourrait bien s'agir de la première modification dont le mécanisme d'action mitotique est réellement élucidé.

## **3) Les combinaisons mitotiques de modifications d'histones**

Si l'on compare la localisation des diverses modifications de la chromatine exposées dans ce manuscrit, on s'aperçoit qu'elles peuvent être rangées en deux classes distinctes.

- la première classe, comprenant les phosphorylations des sérines 10 et 28, initiée en G2, progressant le long des bras du chromosome en prophase, puis maximale en métaphase. Le signal décroît en anaphase, pour atteindre un niveau indétectable en télophase.

- la seconde classe, comprenant la phosphorylation de la sérine 7 de CENP-A, ainsi que celle de la thréonine 11 de l'histone H3 et la méthylation de la lysine 20 de H4, sont initiées en fin de prophase, et sont également maximales en métaphase. Elles ne concernent que l'hétérochromatine péricentrique, et ont quasiment disparu en anaphase. Il semble que chez les plantes, la phosphorylation de l'histone H3 partage également ce profil de localisation.



**Fig. 22: La localisation des modifications mitotiques d'histones permet de les subdiviser en deux classes distinctes.**

Il semblerait donc que l'ensemble de ces modifications ne constitue pas un seul code mitotique, mais bien deux codes distincts, un code de condensation et un code de cohésion, respectivement constitués des première et seconde classes de modifications définies ci-dessus.

De manière analogue à la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3, la fonction exacte de ces combinaisons dans la dynamique mitotique de l'ADN nous est encore largement inconnue. Il sera intéressant de déterminer s'il existe, ainsi qu'il a été suggéré pour la phosphorylation de la sérine 10 l'histone H3 chez la levure (Hsu *et al.*, 2000), un degré de redondance entre modifications de même profil spatio-temporel.

De plus, ainsi qu'il a été exposé en introduction, les modifications d'histones sont interdépendantes, de manière positive ou négative. Il paraît donc probable que les modifications mitotiques d'histones s'influencent entre elles, ou agissent, éventuellement de manière négative, sur les modifications restreintes à l'interphase. La nature de ces relations d'interdépendance reste entièrement à déterminer.

La condensation des chromosomes est un processus cellulaire sous contrôle permanent, faisant intervenir d'une part des facteurs protéiques impliqués dans la dynamique de l'ADN, ainsi que de nombreuses modifications d'histones.

La kinase Aur-B est l'un des principaux régulateurs de la ségrégation des chromosomes. Suivant un profil de localisation très dynamique, elle contrôle l'activité de nombreux acteurs-clés de ce processus. C'est ainsi qu'elle permet la phosphorylation de plusieurs résidus d'histones, événement dont la fonction est en grande partie obscure. Cette étude permettra certainement une meilleure compréhension des règles générales régissant la signalisation, en amont comme en aval, des modifications d'histones, signaux de communication entre la chromatine et la cellule.

**ANNEXE I****Nomenclature des kinases Aurora**

Espèce	Aurora	Appellation	Ref.
<i>S. cerevisiae</i>		Ipl1	Francisco <i>et al.</i> , 1994
<i>S. pombe</i>		Ark1	Petersen <i>et al.</i> , 2001
<i>C. elegans</i>	<b>Aur-A</b>	Air1	Schumacher <i>et al.</i> , 1998a
	<b>Aur-B</b>	Air2	Schumacher <i>et al.</i> , 1998b
		Stu7	Woollard et Hodgkin, 1999
<i>D. melanogaster</i>	<b>Aur-A</b>	Aurora	Glover <i>et al.</i> , 1995
	<b>Aur-B</b>	Ial	Reich <i>et al.</i> , 1999
<i>X. laevis</i>	<b>Aur-A</b>	pEg2	Roghi <i>et al.</i> , 1998
	<b>Aur-B</b>	Airk2	Adams <i>et al.</i> , 2000
<i>R. norvegicus</i>	<b>Aur-B</b>	Aim1	Terada <i>et al.</i> , 1998
<i>M. musculus</i>	<b>Aur-A</b>	Ayk1	Yanai <i>et al.</i> , 1997
		Iak1	Gopalan <i>et al.</i> , 1997
		Ark1	Shindo <i>et al.</i> , 1998
	<b>Aur-B</b>	Stk1	Niwa <i>et al.</i> , 1996
		Ark2	Shindo <i>et al.</i> , 1998
	<b>Aur-C</b>	Aie1	Tseng <i>et al.</i> , 1998
	Iak3	Gopalan <i>et al.</i> , 1998	
<i>H. sapiens</i>	<b>Aur-A</b>	Aik	Kimura <i>et al.</i> , 1997a
		Btak	Sen <i>et al.</i> , 1997
		Stk6	Kimura <i>et al.</i> , 1997b
		Aurora2	Bischoff <i>et al.</i> , 1998
		Ark1	Shindo <i>et al.</i> , 1998
	<b>Aur-B</b>	Aik2	Prigent <i>et al.</i> , 1999
		Stk12/Aik2	Kimura <i>et al.</i> , 1998
		Aim1	Katayama <i>et al.</i> , 1998
		Aurora1	Bischoff <i>et al.</i> , 1998
	<b>Aur-C</b>	Ark2	Shindo <i>et al.</i> , 1998
		Aie2	Tseng <i>et al.</i> , 1998
		Stk13	Bernard <i>et al.</i> , 1998
		Aik3	Kimura <i>et al.</i> , 1999

## ANNEXE II

## Alignement de séquence des kinases Aurora de différentes espèces

(alignement bientôt disponible sur le site de Pfizer inc.)

Hs-AurC	- - - - - M S S P R A V	V	Q	L	G	K	A	Q	P	A	G	E	E	L	- - - - -	20
Mm-AurC	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	E	P	S	T	S	T	7
Hs-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	A	Q	K	E	N	S	11
Mm-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	A	Q	K	E	N	S	11
Rn-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	A	Q	K	E	N	S	11
Hs-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	D	R	S	K	E	N	20
Mm-AurA	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	D	R	C	K	E	N	20
Xl-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Xl-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	E	R	A	V	K	E	19
Dm-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	S	H	P	S	D	H	31
Ce-	M P L N N P P S	K I H S K I T L	I	M	S	G	K	E	N	T	A	-	-	-	-	25
Ce-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	E	N	K	P	P	V	13
Sp-Ark1	- M V L P Q N V	N N N A P T S	G R T C	Q	K	P	T	S	A	F	F	Y	E	I	M	34
Sc-Ipl1	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	Q	R	N	S	L	-	18
At-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	S	K	K	S	T	E	12
At-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Dm-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	M	T	L	S	R	A	K	18
Hs-AurC	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Mm-AurC	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Hs-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
Mm-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
Rn-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11
Hs-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
Mm-AurA	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26
Xl-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10
Xl-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29
Dm-	N L L L G K K P	N S E N M A P	D S K P L P	G S S G	A L I R S	A A T	T	V	R	P	A	T	K	-	-	71
Ce-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
Ce-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
Sp-Ark1	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	38
Sc-Ipl1	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23
At-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
At-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Dm-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
Hs-AurC	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34
Mm-AurC	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Hs-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45
Mm-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45
Rn-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	45
Hs-	T Q Q F P C Q N P L	P V N S G Q A Q R V L C P S	N S S Q	R V P L S	Q A Q K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66
Mm-AurA	T E Q I P S Q N L G S	A S S G Q A Q R V L C P S	N S S Q	R V P L S	Q A Q K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64
Xl-AurB	S Q P P S T Q V R P P V T	G V S A Q R I L G P S N V	P Q R	V M M Q A Q K	P V L S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	50
Xl-	N Q P Q S T Q F R P P G T	A V S A Q R I L G P S N V	P Q R	V M M Q A Q K	P I L S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	69
Dm-	P G L G G S N S I A S S E	G N N F Q K P M V P S	V K T T S E F A A	P A P V A P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	111
Ce-	I D D Q K A E V I L S L T E	D S R P Q R V D Q A R E E S C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55
Ce-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
Sp-Ark1	L N C L S V S T P S T T A N P G R	Q Q L L R L A V S N Q R Q V N N V S	L A N G K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	78
Sc-Ipl1	P N T S R I N K P W R I S H S P Q	Q R N P N S K I P S P V R E K L N R L P V N N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63
At-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
At-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Dm-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18
Hs-AurC	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34
Mm-AurC	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
Hs-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51
Mm-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51
Rn-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51
Hs-	S H K P V Q N - - - -	Q K Q K Q L Q A T S V P H P V S R P L N N T Q K	S K Q Q P L P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	103
Mm-AurA	G Q K P A - - - - -	- - - - - P K Q L P A A S V P R P V S R - L N N P Q Q K N E Q P - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94
Xl-AurB	N Q K P T A Q G L L R P A T H G H Q	T S K P Q G P N E N R N P Q Q T S H S S T P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90
Xl-	S Q K P T T Q I P L R P A T Q G H Q	S S K P Q G P N E N R N P Q Q T S H S S T P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	109
Dm-	I K K P E S L S K Q K P T A A - - - -	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	133
Ce-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55
Ce-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13
Sp-Ark1	E N K R T S - - - - -	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	87
Sc-Ipl1	K K F L D M E S S K I P S P I R K A T S	S K M I H E N K K L P - - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	94
At-	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
At-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Dm-AurB	- - - - -	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22



motif d'activation  
xRxTxCGTx

Hs-AurC	N L L L G F R G E V K I A D F G W S V	H T P S L R R R K M C G T L D Y L P P E	209
Mm-AurC	N L L L G L N G E V K I S D F G W S V	H T P S L R R R K T M C G T L D Y L P P E	182
Hs-AurB	N L L L G L K G E L K I A D F G W S V	H A P S L R R R K T M C G T L D Y L P P E	243
Mm-AurB	N L L L G L Q G E L K I A D F G W S V	H A P S L R R R K T M C G T L D Y L P P E	248
Rn-AurB	N L L L G L Q G E L K I A D F G W S V	H A P S L R R R K T M C G T L D Y L P P E	246
Hs-	N L L L G S A G E L K I A D F G W S V	H A P S S R R R T T L C G T L D Y L P P E	299
Mm-AurA	N L L L G S N G E L K I A D F G W S V	H A P S S R R R T T L C G T L D Y L P P E	290
Xl-AurB	N L L L G S N G E L K I A D F G W S V	H A P S S R R R T T L C G T L D Y L P P E	287
Xl-	N L L L G S N G E L K I A D F G W S V	H A P S S R R R T T L C G T L D Y L P P E	306
Dm-	N L L L G H K G V L K I A D F G W S V	H E P N S M R M T L C G T V D Y L P P E	332
Ce-	N L L L G S K L N L K L A D F G W S V	V A D H S K R H T L C G T M D Y L A P E	229
Ce-AurB	N L L L G S Q G E L K I G D F G W S V	H A P S N K R Q T M C G T M D Y L P P E	196
Sp-Ark1	N I L L G I D G E I K L G S D F G W S V	H A P S N R R R T T L C G T L D Y L P P E	284
Sc-Ipl1	N I L L G F N N V I K L T D F G W S I	N P P E N R R K T V C G T I D Y L S P E	271
At-	N L L L G H E N G R L K I A D F G W S V	Q S - S N K R K T M C G T L D Y L A P E	187
At-AurB	N L L L G A Q G E L K I A D F G W S V	H T - F N R R R T M C G T L D Y L P P E	184
Dm-AurB	N I L L T S T D D L K L A D F G W S A	H T P N N K R R T L C G T L D Y L P P E	221
↓			
Hs-AurC	M I E G R T Y D E K V D L W C I G V L C Y E L L V G Y P P F E S	A S H S E T Y	248
Mm-AurC	M I A Q K P Y N E M V D L W C I G V L C Y E L L V G K P P F E S	S T S S E T Y	221
Hs-AurB	M I E G R M H N E K V D L W C I G V L C Y E L L V G N P P F E S	A S H N E T Y	282
Mm-AurB	M I E G R M H N E M V D L W C I G V L C Y E L M V G N P P F E S	P S H S E T Y	287
Rn-AurB	M I E G R M H N E M V D L W C I G V L C Y E L M V G N P P F E S	P S H S E T Y	285
Hs-	M I E G R M H D E K V D L W S L G V L C Y E F L V G K P P F E A	N T Y Q E T Y	338
Mm-AurA	M I E G R M H D E K V D L W S L G V L C Y E F L V G M P P F E A	H T Y Q E T Y	329
Xl-AurB	M I E G R M H D E K V D L W S L G V L C Y E F L V G K P P F E T	D T H Q E T Y	326
Xl-	M I E G R M H D E T V D L W S L G V L C Y E F L V G K P P F E T	D T H Q E T Y	345
Dm-	M V Q G K P H T K N V D L W S L G V L C F E L L V G Y H A P P F Y S K	N - Y D E T Y	371
Ce-	M V S N Q P H D F N V D L W A I G I L L F E M L V G Y A P P F A N Q	T G - D K L I	268
Ce-AurB	M V N G A D H S D A V D L W A I G V L C Y E F L V G Y K P P F E H	E D Q S K T Y	235
Sp-Ark1	M V E G K E H T E K V D L W S L G V L T Y E F L V G A P P F E D M	S G H S A T Y	324
Sc-Ipl1	M V E S R E Y D H T I D A W A L G V L A F E L L T Y G N P P F E E E	M K - D T T Y	310
At-	M V E N R D H D Y A V D N W T L G I L C Y E F L Y G N P P F E A	E S Q K D T F	226
At-AurB	M V E S V E H D A S V D T W S L G I L C Y E F L Y G V P P F E A	R E H S E T Y	223
Dm-AurB	M V D G N S Y D D S V D Q W C L G I L C Y E F V V G C P P F E S	N S T - E S T Y	260
↓			
Hs-AurC	R R I L K V D V R F P - - - L S M P L G A R D L I S R L L R Y Q P L E R L P L A Q	A Q	286
Mm-AurC	R R I R Q V D F K F P - - - S S V P A G A Q D L I S K L L R Y H P S L E R L P L A Q	A Q	259
Hs-AurB	R R I V K V D L K F P - - - A S V P T G A Q Q D L I S K L L R H N P S E R L P L A Q	A Q	320
Mm-AurB	R R I V K V D L K F P - - - S S V P S G A Q Q D L I S K L L K H N P S W Q R L P L A Q	A Q	325
Rn-AurB	R R I V K V D L K F P - - - S S M P L G A K D L I S K L L K H N P S Q R L P L A Q	A Q	323
Hs-	K R I S R V E F T F P - - - D F V T E G A R D L I S R L L K H N P S Q R P M L R E	R E	376
Mm-AurA	R R I S R V E F T F P - - - D F V T E G A R D L I S R L L K H N A S Q R L T L A E	A E	367
Xl-AurB	R R I S K V E F Q Y P - - - P Y V S E E A R D L V S K L L K H N P N H R L P L K G	K G	364
Xl-	K K I L K V D Y K L P - - - E H I S K A A S H L I S K L L V L N P Q H R L P L K G	K G	383
Dm-	A R I K E C K I Y I P - - - S V V T D G A A S L I N A I I K K E R L P L V D	V D	409
Ce-	A A I K A A R F T Y P - - - S V V K K G A R D L I G R L L V V D P K A R C T L E Q	E Q	306
Ce-AurB	K R I A K V D L K I P - - - S F V P P D A R D L I S R L L Q H N P E K R M S L E Q	E Q	273
Sp-Ark1	K R I A A L D I K M P - - - S N I S Q D A Q D L I L K L L K Y D P K D R M R L G D	G D	362
Sc-Ipl1	K R I L K I D L S F P L T P N V S E E A K N L I S Q L L V K D P S K R L S I E K	E K	348
At-	K R I V Q V D L K F P P K P I V S S A K D L I S Q M L V K E S T Q R L A L H K	H K	266
At-AurB	S K I R R M E I S Y P - - - S H L S K G C K E L I G G C F A R Q S K G R I T L V D	V D	263
Dm-AurB			298
↓			
Hs-AurC	I L K H P W V Q A H S R R V L P P C A Q M A S		309
Mm-AurC	V L K H P W V R E H S R R V L P P C V H G A		281
Hs-AurB	V S A H P W V R A N S R R V L P P S A L Q S V A		344
Mm-AurB	V S A H P W V R A N S R R V L P P S A L		345
Rn-AurB	V S A H P W V R A N S R R V L P P S A L		343
Hs-	V L E H P W I T A N S S K P S N C Q - N K E S A S K Q S		403
Mm-AurA	V L E H P W I K A N S S K P P T G H T S K E P T S K S S		395
Xl-AurB	V L E H P W I V K N S Q Q R K K - - K D E P L A G A Q		389
Xl-	V L E H P W I I K N S Q L K K - - - K D E P L P G A Q		407
Dm-	V M V H P W I L A H T Q		421
Ce-	I M A H P W I K E M K Q R E D I E V P L F I S T L T K S R N N S T A N Q		343
Ce-AurB	V K E H Y W I Q G M M E A K I R A E K Q K I E K E A S L R N H		305
Sp-Ark1	V M R H P W I V K Y K D S W T R K S S E S S		384
Sc-Ipl1	V K M H P W I L R N K P F W E N K R L		367
At-	I M Q H P W I V K N A D P K G V C A S I D I		288
At-AurB	L L E H P W I V Q N A D P S G L Y R G		282
Dm-AurB	V M T H Y W V K A G M A E R E L Q L Q K R D R G K E N T A R N		329

boîte de dégradation

**Adams RR, Wheatley SP, Gouldsworthy AM, Kandels-Lewis SE, Carmena M, Smythe C, Gerloff DL, Earnshaw WC (2000).** INCENP binds the Aurora-related kinase AIRK2 and is required to target it to chromosomes, the central spindle and cleavage furrow. *Curr Biol*, vol. 10, n° 17, pp. 1075-1078.

**Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC (2001).** Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol*, vol. 11, n° 2, pp. 49-54.

**Ainsztein AM, Kandels-Lewis SE, Mackay AM, Earnshaw WC (1998).** INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. *J Cell Biol*, vol. 143, n° 7, pp. 1763-1774.

**Ajiro K (2000).** Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells. An association with DNA fragmentation. *J Biol Chem*, vol. 275, n° 1, pp. 439-443.

**Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE (1964).** Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *PNAS*, vol. 51, n° 5, pp. 786-794.

**Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997).** A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*, vol. 3, n° 8, pp. 917-921.

**Anest V, Hanson JL, Cogswell PC, Steinbrecher KA, Strahl BD, Baldwin AS (2003).** A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature*, vol. 423, n° 6940, pp. 659-663.

**Arlot-Bonnemains Y, Klotzbucher A, Giet R, Uzbekov R, Bihan R, Prigent C (2001).** Identification of a functional destruction box in the *Xenopus laevis* aurora-A kinase pEg2. *FEBS Lett*, vol. 508, n° 1, pp. 149-152.

**Ausio J, Dong F, van Holde KE (1989).** Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone "tails" in the stabilization of the nucleosome. *J Mol Biol*, vol. 206, n° 3, pp. 451-463.

**Ball AR Jr, Schmiesing JA, Zhou C, Gregson HC, Okada Y, Doi T, Yokomori K (2002).** Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. *Mol Cell Biol*, vol. 22, n° 16, pp. 5769-5781.

**Banéres JL, Martin A, Parello J (1997).** The N tails of histones H3 and H4 adopt a highly structured conformation in the nucleosome. *J Mol Biol*, vol. 273, n° 3, pp. 503-508.

**Bannister AJ, Kouzarides T (1996).** The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, vol. 384, n° 6610, pp. 641-643.

**Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001).** Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, vol. 410, n° 6824, pp. 120-124.

**Bannister AJ, Schneider R, Kouzarides T (2002).** Histone methylation: dynamic or static?. *Cell*, vol. 109, n° 7, pp. 801-806.

- Baxevanis AD, Landsman D (1996).** Histone Sequence Database: a compilation of highly-conserved nucleoprotein sequences. *Nucleic Acids Res*, vol. 24, n° 1, pp. 245-7.
- Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C (1998).** Cloning of STK13, a third human protein kinase related to Drosophila aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. *Genomics*, vol. 53, n° 3, pp. 406-409.
- Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T, Schreiber SL (2002).** Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 99, n° 13, pp. 8695-8700.
- Biggins S, Severin FF, Bhalla N, Sassoon I, Hyman AA, Murray AW (1999).** The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev*, vol. 13, n° 5, pp. 532-544.
- Biggins S, Murray AW (2001).** The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev*, vol. 15, n° 23, pp. 3118-3129.
- Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD (1998).** A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*, vol. 17, n° 11, pp. 3052-3065.
- Bishop JD, Schumacher JM (2002).** Phosphorylation of the carboxyl terminus of inner centromere protein (INCENP) by the Aurora B Kinase stimulates Aurora B kinase activity. *J Biol Chem*, vol. 277, n° 31, pp. 27577-27580.
- Blangy A, Lane HA, d'Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA (1995).** Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell*, vol. 83, n° 7, pp. 1159-1169.
- Bolton MA, Lan W, Powers SE, McClelland ML, Kuang J, Stukenberg PT (2002).** Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell*, vol. 13, n° 9, pp. 3064-3077.
- Bradbury EM, Inglis RJ, Matthews HR, Sarner N (1973).** Phosphorylation of very-lysine-rich histone in *Physarum polycephalum*. Correlation with chromosome condensation. *Eur J Biochem*, vol. 33, n° 1, pp. 131-139.
- Bradbury EM (1992).** Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays*, vol. 14, n° 1, pp. 9-16.
- Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, Cheung WL, Davie JK, Dent SY, Winston F, Allis CD (2001).** Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, vol. 15, n° 24, pp. 3286-95.
- Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001).** ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 42462 - 42467.

**Celeste A, Petersen S, Romanienko Pj, Fernandez-Capetillo O, Chen Ht, Sedelnikova Oa, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio Mj, Redon C, Pilch Dr, Olaru A, Eckhaus M, Camerini-Otero Rd, Tessarollo L, Livak F, Manova K, Bonner Wm, Nussenzweig Mc, Nussenzweig A (2002).** Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, vol. 296, n° 5569, pp. 922-927.

**Celeste A, Fernandez-Capetillo O, Kruhlak MJ, Pilch DR, Staudt DW, Lee A, Bonner RF, Bonner WM, Nussenzweig A (2003).** Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*, vol. 5, n° 7, pp. 675-679.

**Chen HT, Bhandoola A, Difilippantonio MJ, Zhu J, Brown MJ, Tai X, Rogakou EP, Brotz TM, Bonner WM, Ried T, Nussenzweig A (2000).** Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science*, vol. 290, n° 5498, pp. 1962-1965.

**Chen D, Hinkley CS, Henry RW, Huang S (2002).** TBP dynamics in living human cells: constitutive association of TBP with mitotic chromosomes. *Mol Biol Cell*, vol. 13, n° 1, pp. 276-284.

**Chen J, Jin S, Tahir SK, Zhang H, Liu X, Sarthy AV, McGonigal TP, Liu Z, Rosenberg SH, Ng SC (2003).** Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *J Biol Chem*, vol. 278, n° 1, pp. 486-490.

**Cheung P, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000a).** Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, vol. 103, n° 2, pp. 263-271.

**Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD (2000b).** Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell*, vol. 5, n° 6, pp. 905-915.

**Cheung WL, Ajiro K, Samejima K, Kloc M, Cheung P, Mizzen CA, Beeser A, Etkin LD, Chernoff J, Earnshaw WC, Allis CD (2003).** Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*, vol. 113, n° 4, pp. 507-17.

**Chew TL, Masaracchia RA, Goeckeler ZM, Wysolmerski RB (1998).** Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J Muscle Res Cell Motil*, vol. 19, n° 8, pp. 839-854.

**Christensen MO, Larsen MK, Barthelmes HU, Hock R, Andersen CL, Kjeldsen E, Knudsen BR, Westergaard O, Boege F, Mielke C (2002).** Dynamics of human DNA topoisomerases IIalpha and IIbeta in living cells. *J Cell Biol*, vol. 157, n° 1, pp. 31-44.

**Chung CY, Firtel RA (1999).** PAKa, a putative PAK family member, is required for cytokinesis and the regulation of the cytoskeleton in *Dictyostelium discoideum* cells during chemotaxis. *J Cell Biol*, vol. 147, n° 3, pp. 559-576.

**Clayton AL, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC (2000).** Phosphoacetylation of histone H3 on *c-fos*- and *c-jun*-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J*, vol. 19, n° 14, pp. 3714-3726.

**Cooke CA, Heck MM, Earnshaw WC (1987).** The inner centromere protein (INCENP) antigens: movement from inner centromere to midbody during mitosis. *J Cell Biol*, vol. 105, n° 5, pp. 2053-2067.

**Crosio C, Cermakian N, Allis CD, Sassone-Corsi P (2000).** Light induces chromatin modification in cells of the mammalian circadian clock. *Nat Neurosci*, vol. 3, n° 12, pp. 1241-1247.

**Crosio C, Fimia GM, Loury R, Kimura M, Okano Y, Zhou H, Sen S, Allis CD, Sassone-Corsi P (2002).** Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases. *Mol Cell Biol*, vol. 22, n° 3, pp. 874-885.

**De Cesare D, Jacquot S, Hanauer A, Sassone-Corsi P (1998).** Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor-induced phosphorylation of CREB protein and transcription of *c-fos* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 95, n° 21, pp. 12202-12207.

**de la Barre AE, Gerson V, Gout S, Creaven M, Allis CD, Dimitrov S (2000).** Core histone N-termini play an essential role in mitotic chromosome condensation. *EMBO J*, vol. 19, n° 3, pp. 379-391.

**de la Barre AE, Angelov D, Molla A, Dimitrov S (2001).** The N-terminus of histone H2B, but not that of histone H3 or its phosphorylation, is essential for chromosome condensation. *EMBO J*, vol. 20, n° 22, pp. 6383-6393.

**De Souza CP, Osmani AH, Wu LP, Spotts JL, Osmani SA (2000).** Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell*, vol. 102, n° 3, pp. 293-302.

**Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N, Taylor SS (2003).** Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*, vol. 161, n° 2, pp. 267-280.

**Dutertre S, Descamps S, Prigent C (2002).** On the role of aurora-A in centrosome function. *Oncogene*, vol. 21, n° 40, pp. 6175-6183.

**Eyers PA, Erikson E, Chen LG, Maller JL (2003).** A novel mechanism for activation of the protein kinase aurora A. *Curr Biol*, vol. 13, n° 8, pp. 691-697.

**Felsenfeld G, Groudine M (2003).** Controlling the double helix. *Nature*, vol. 42, n° 6921, pp. 448-53.

**Francisco L, Wang W, Chan CS (1994).** Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol*, vol. 14, n° 7, pp. 4731-4740.

**Giet R, Prigent C (1999).** Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *J Cell Sci*, vol. 112, n° 21, pp. 3591-3601.

**Giet R, Uzbekov R, Cubizolles F, Le Guellec K, Prigent C (1999).** The *Xenopus laevis* aurora-related protein kinase pEg2 associates with and phosphorylates the kinesin-related protein XIEg5. *J Biol Chem*, vol. 274, n° 21, pp. 15005-15013.

**Giet R, Prigent C (2000).** The *Xenopus laevis* aurora/Ip11p-related kinase pEg2 participates in the stability of the bipolar mitotic spindle. *Exp Cell Res*, vol. 258, n° 1, pp. 145-151.

**Giet R, Prigent C (2001).** The non-catalytic domain of the *Xenopus laevis* auroraA kinase localises the protein to the centrosome. *J Cell Sci*, vol. 114, n° 11, pp. 2095-2104.

**Giet R, Glover DM (2001).** *Drosophila* aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol*, vol. 152, n° 4, pp. 669-682.

**Gimenez-Abian JF, Clarke DJ, Mullinger AM, Downes CS, Johnson RT (1995).** A postprophase topoisomerase II-dependent chromatid core separation step in the formation of metaphase chromosomes. *J Cell Biol*, vol. 131, n° 1, pp. 7-17.

**Glotzer M, Murray AW, Kirschner MW (1991).** Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, vol. 349, n° 6305, pp. 132-138.

**Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H (1995).** Mutations in *aurora* prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, vol. 81, n° 1, pp. 95-105.

**Gopalan G, Chan CS, Donovan PJ (1997).** A novel mammalian, mitotic spindle-associated kinase is related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *J Cell Biol*, vol. 138, n° 3, pp. 643-656.

**Gopalan G, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Donovan PJ (1998).** Chromosome localization of two new mammalian kinases related to yeast and fly chromosome segregation-regulators. *Mamm Genome*, vol. 9, n° 1, pp. 86-87.

**Goto H, Tomono Y, Ajiro K, Kosako H, Fujita M, Sakurai M, Okawa K, Iwamatsu A, Okigaki T, Takahashi T, Inagaki M (1999).** Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J Biol Chem*, vol. 274, n° 36, pp. 25543-25549.

**Goto H, Yasui Y, Nigg EA, Inagaki M (2002).** Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine28 with regard to the mitotic chromosome condensation. *Genes Cells*, vol. 7, n° 1, pp. 11-17.

**Gottesfeld JM, Forbes DJ (1997).** Mitotic repression of the transcriptional machinery. *Trends Biochem Sci*, vol. 22, n° 6, pp. 197-202.

**Grant PA, Sterner DE, Duggan LJ, Workman JL, Berger SL (1998).** The SAGA unfolds: convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. *Trends Cell Biol*, vol. 8, n° 5, pp. 193-197.

- Gregory PD, Wagner K, Horz W (2001).** Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res*, vol. 265, n° 2, pp. 195-202.
- Guo XW, Th'ng JP, Swank RA, Anderson HJ, Tudan C, Bradbury EM, Roberge M (1995).** Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation. *EMBO J*, vol. 14, n° 5, pp. 976-985.
- Gurley LR, Walters RA, Tobey RA (1973).** Histone phosphorylation in late interphase and mitosis. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 50, n° 3, pp. 744-750.
- Gurley LR, D'Anna JA, Barham SS, Deaven LL, Tobey RA (1978).** Histone phosphorylation and chromatin structure during mitosis in Chinese hamster cells. *Eur J Biochem*, vol. 84, n° 1, pp. 1-15.
- Hagstrom KA, Holmes VF, Cozzarelli NR, Meyer BJ (2002).** *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev*, vol. 16, n° 6, pp. 729-742.
- Ha Kim Y, Yeol Choi J, Jeong Y, Wolgemuth DJ, Rhee K (2002).** Nek2 localizes to multiple sites in mitotic cells, suggesting its involvement in multiple cellular functions during the cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 290, n° 2, pp. 730-736.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988).** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, vol. 241, n° 4861, pp. 42-52.
- Hannak E, Kirkham M, Hyman AA, Oegema K (2001).** Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, vol. 155, n° 7, pp. 1109-1116.
- Hans F, Dimitrov S (2001).** Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, vol. 20, n° 24, pp. 3021-3027.
- Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C (1988).** A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J*, vol. 7, n° 5, pp. 1395-1402.
- Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, Van Hooser A, Ranalli T, Brinkley BR, Bazett-Jones DP, Allis CD (1997).** Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, vol. 106, n° 6, pp. 348-360.
- Hendzel MJ, Nishioka WK, Raymond Y, Allis CD, Bazett-Jones DP, Th'ng JP (1998).** Chromatin condensation is not associated with apoptosis. *J Biol Chem*, vol. 273, n° 38, pp. 24470-24478.
- Hill CS, Rimmer JM, Green BN, Finch JT, Thomas JO (1991).** Histone-DNA interactions and their modulation by phosphorylation of -Ser-Pro-X-Lys/Arg- motifs. *EMBO J*, vol. 10, n° 7, pp. 1939-48.

**Hirano T, Kobayashi R, Hirano M (1997).** Condensins, chromosome condensation protein complexes containing XCAP-C, XCAP-E and a *Xenopus* homolog of the *Drosophila* Barren protein. *Cell*, vol. 89, n° 4, pp. 511-521.

**Hirano T (1999).** SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev*, vol. 13, n° 1, pp. 11-19.

**Hirano T (2002).** The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev*, vol. 16, n° 4, pp. 399-414.

**Honda K, Mihara H, Kato Y, Yamaguchi A, Tanaka H, Yasuda H, Furukawa K, Urano T (2000).** Degradation of human Aurora2 protein kinase by the anaphase-promoting complex-ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene*, vol. 19, n° 24, pp. 2812-2819.

**Honda R, Korner R, Nigg EA (2003).** Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis. *Mol Biol Cell*, vol. 14, n° 8, pp. 3325-3341.

**Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM (1993).** Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem*, vol. 268, n° 1, pp. 305-314.

**Hougaard DM, Bolund L, Fujiwara K, Larsson LI (1987).** Endogenous polyamines are intimately associated with highly condensed chromatin *in vivo*. A fluorescence cytochemical and immunocytochemical study of spermine and spermidine during the cell cycle and in reactivated nuclei. *Eur J Cell Biol*, vol. 44, n° 1, pp. 151-155.

**Howman EV, Fowler KJ, Newson AJ, Redward S, MacDonald AC, Kalitsis P, Choo KH (2000).** Early disruption of centromeric chromatin organization in centromere protein A (*Cenpa*) null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, n° 3, pp. 1148-1153.

**Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, Lin R, Smith MM, Allis CD (2000).** Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell*, vol. 102, n° 3, pp. 279-291.

**Huang H, Kahana A, Gottschling DE, Prakash L, Liebman SW (1997).** The ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, vol. 17, n° 11, pp. 6693-6699.

**Huletsky A, Niedergang C, Frechette A, Aubin R, Gaudreau A, Poirier GG (1985).** Sequential ADP-ribosylation pattern of nucleosomal histones. ADP-ribosylation of nucleosomal histones. *Eur J Biochem*, vol. 146, n° 2, pp. 277-285.

**Iwasaki T, Murata-Hori M, Ishitobi S, Hosoya H (2001).** Diphosphorylated MRLC is required for organization of stress fibers in interphase cells and the contractile ring in dividing cells. *Cell Struct Funct*, vol. 26, n° 6, pp. 677-683.

**Jessberger R (2002).** The many functions of SMC proteins in chromosome dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3, n° 10, pp. 767-778.

**Johnson CA, O'Neill LP, Mitchell A, Turner BM (1998).** Distinctive patterns of histone H4 acetylation are associated with defined sequence elements within both heterochromatic and euchromatic regions of the human genome. *Nucleic Acids Res*, vol. 26, n° 4, pp. 994-1001.

**Kallio MJ, McClelland ML, Stukenberg PT, Gorbsky GJ (2002).** Inhibition of aurora B kinase blocks chromosome segregation, overrides the spindle checkpoint, and perturbs microtubule dynamics in mitosis. *Curr Biol*, vol. 12, n° 11, pp. 900-905.

**Kang J, Cheeseman IM, Kallstrom G, Velmurugan S, Barnes G, Chan CS (2001).** Functional cooperation of Dam1, Ipl1, and the inner centromere protein (INCENP)-related protein Sli15 during chromosome segregation. *J Cell Biol*, vol. 155, n° 5, pp. 763-774.

**Kaszas E, Cande WZ (2000).** Phosphorylation of histone H3 is correlated with changes in the maintenance of sister chromatid cohesion during meiosis in maize, rather than the condensation of the chromatin. *J Cell Sci*, vol. 113, n° 18, pp. 3217-3226.

**Katayama H, Ota T, Morita K, Terada Y, Suzuki F, Katoh O, Tatsuka M (1998).** Human AIM-1: cDNA cloning and reduced expression during endomitosis in megakaryocyte-lineage cells. *Gene*, vol. 224, n°s 1-2, pp. 1-7.

**Katayama H, Zhou H, Li Q, Tatsuka M, Sen S (2001).** Interaction and feedback regulation between STK15/BTAK/Aurora-A kinase and protein phosphatase 1 through mitotic cell division cycle. *J Biol Chem*, vol. 276, n° 49, pp. 46219-46224.

**Kimura K, Hirano T (1997).** ATP-dependent positive supercoiling of DNA by 13S condensin: a biochemical implication for chromosome condensation. *Cell*, vol. 90, n° 4, pp. 625-634.

**Kimura M, Kotani S, Hattori T, Sumi N, Yoshioka T, Todokoro K, Okano Y (1997a).** Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1. *J Biol Chem*, vol. 272, n° 21, pp. 13766-13771.

**Kimura M, Matsuda Y, Eki T, Yoshioka T, Okumura K, Hanaoka F, Okano Y (1997b).** Assignment of STK6 to human chromosome 20q13.2-->q13.3 and a pseudogene STK6P to 1q41-->q42. *Cytogenet Cell Genet*, vol. 79, n°s 3-4, pp. 201-203.

**Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Sumi N, Okano Y (1998).** Identification and characterization of STK12/Aik2: a human gene related to aurora of Drosophila and yeast IPL1. *Cytogenet Cell Genet*, vol. 82, n°s 3-4, pp. 147-152.

**Kimura M, Matsuda Y, Yoshioka T, Okano Y (1999).** Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/Ipl1-related protein kinase, AIK3. *J Biol Chem*, vol. 274, n° 11, pp. 7334-7340.

**Kuo MH, Brownell JE, Sobel RE, Ranalli TA, Cook RG, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD (1996).** Transcription-linked acetylation by Gcn5p of histones H3 and H4 at specific lysines. *Nature*, vol. 383, n° 6597, pp. 269-272.

**Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T (2001).** Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*, vol. 410, n° 6824, pp. 116-120.

**Lachner M, Jenuwein T (2002).** The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol*, vol. 14, n° 3, pp. 286-298.

**Langan TA, Gautier J, Lohka M, Hollingsworth R, Moreno S, Nurse P, Maller J, Sclafani RA (1989).** Mammalian growth-associated H1 histone kinase: a homolog of cdc2+/CDC28 protein kinases controlling mitotic entry in yeast and frog cells. *Mol Cell Biol*, vol. 9, n° 9, pp. 3860-3868.

**Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP (1993).** A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, vol. 72, n° 1, pp. 73-84.

**Li F, Adam L, Vadlamudi RK, Zhou H, Sen S, Chernoff J, Mandal M, Kumar R (2002).** p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells. *EMBO Rep*, vol. 3, n° 8, pp. 767-773.

**Lo WS, Trievel RC, Rojas JR, Duggan L, Hsu JY, Allis CD, Marmorstein R, Berger SL (2000).** Phosphorylation of serine 10 in histone H3 is functionally linked *in vitro* and *in vivo* to Gcn5-mediated acetylation at lysine 14. *Mol Cell*, vol. 5, n° 6, pp. 917-926.

**Lo WS, Duggan L, Tolga NC, Emre, Belotserkovskya R, Lane WS, Shiekhattar R, Berger SL (2001).** Snf1--a histone kinase that works in concert with the histone acetyltransferase Gcn5 to regulate transcription. *Science*, vol. 293, n° 5532, pp. 1142-1146.

**Losada A, Hirano M, Hirano T (1998).** Identification of *Xenopus* SMC protein complexes required for sister chromatid cohesion. *Genes Dev*, vol. 12, n° 13, pp. 1986-1997.

**Losada A, Hirano T (2001a).** Shaping the metaphase chromosome: coordination of cohesion and condensation. *Bioessays*, vol. 23, n° 10, pp. 924-935.

**Losada A, Hirano T (2001b).** Intermolecular DNA interactions stimulated by the cohesin complex *in vitro*: implications for sister chromatid cohesion. *Curr Biol*, vol. 11, n° 4, pp. 268-272.

**Losada A, Hirano M, Hirano T (2002).** Cohesin release is required for sister chromatid resolution, but not for condensin-mediated compaction, at the onset of mitosis. *Genes Dev*, vol. 16, n° 23, pp. 3004-3016.

**Loury R, Sassone-Corsi P (2003).** Histone phosphorylation: how to proceed. *Methods*, vol. 31, n° 1, pp. 40-48.

**Löwe J, Cordell SC, van den Ent F (2001).** Crystal structure of the SMC head domain: an ABC ATPase with 900 residues antiparallel coiled-coil inserted. *J Mol Biol*, vol. 306, n° 1, pp. 25-35.

**Lu KP, Hunter T (1995).** The NIMA kinase: a mitotic regulator in *Aspergillus nidulans* and vertebrate cells. *Prog Cell Cycle Res*, vol. 1, pp. 187-205.

- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997).** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, vol. 389, n° 6648, pp. 251-260.
- Mahadevaiah SK, Turner JM, Baudat F, Rogakou EP, de Boer P, Blanco-Rodriguez J, Jasin M, Keeney S, Bonner WM, Burgoyne PS (2001).** Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat Genet*, vol. 27, n° 3, pp. 271-276.
- Mahadevan LC, Willis AC, Barratt MJ (1991).** Rapid histone H3 phosphorylation in response to growth factors, phorbol esters, okadaic acid, and protein synthesis inhibitors. *Cell*, vol. 65, n° 5, pp. 775-783.
- Martineau-Thuillier S, Andreassen PR, Margolis RL (1998).** Colocalization of TD-60 and INCENP throughout G2 and mitosis: evidence for their possible interaction in signalling cytokinesis. *Chromosoma*, vol. 107, n°s 6-7, pp. 461-470.
- Melby TE, Ciampaglio CN, Briscoe G, Erickson HP (1998).** The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *J Cell Biol*, vol. 142, n° 6, pp. 1595-1604.
- Mello JA, Almouzni G (2001).** The ins and outs of nucleosome assembly. *Curr Opin Genet Dev*, vol. 11, n° 2, pp. 136-141.
- Meraldi P, Honda R, Nigg EA (2002).** Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53<sup>-/-</sup> cells. *EMBO J*, vol. 21, n° 4, pp. 483-492.
- Meraldi P, Nigg EA (2002).** The centrosome cycle. *FEBS Lett*, vol. 521, n°s 1-3, pp. 9-13.
- Mérienne K, Pannetier S, Harel-Bellan A, Sassone-Corsi P (2001).** Mitogen-regulated RSK2-CBP interaction controls their kinase and acetylase activities. *Mol Cell Biol*, vol. 21, n° 20, pp. 7089-7096.
- Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K (1997).** Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, vol. 91, n° 1, pp. 35-45.
- Millband DN, Campbell L, Hardwick KG (2002).** The awesome power of multiple model systems: interpreting the complex nature of spindle checkpoint signaling. *Trends Cell Biol*, vol. 12, n° 5, pp. 205-209.
- Morrison C, Henzing AJ, Jensen ON, Osheroff N, Dodson H, Kandels-Lewis SE, Adams RR, Earnshaw WC (2002).** Proteomic analysis of human metaphase chromosomes reveals topoisomerase II alpha as an Aurora B substrate. *Nucleic Acids Res*, vol. 30, n° 23, pp. 5318-5327.
- Murata-Hori M, Fumoto K, Fukuta Y, Iwasaki T, Kikuchi A, Tatsuka M, Hosoya H (2000).** Myosin II regulatory light chain as a novel substrate for AIM-1, an aurora/Ipl1p-related kinase from rat. *J Biochem (Tokyo)*, vol. 128, n° 6, pp. 903-907.
- Nielsen SJ, Schneider R, Bauer UM, Bannister AJ, Morrison A, O'Carroll D, Firestein R, Cleary M, Jenuwein T, Herrera RE, Kouzarides T (2001).** Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*, vol. 412, n° 6846, pp. 561-565.

- Nigg EA (2001).** Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 2, n° 1, pp. 21-32.
- Nightingale KP, Wellinger RE, Sogo JM, Becker PB (1998).** Histone acetylation facilitates RNA polymerase II transcription of the *Drosophila hsp26* gene in chromatin. *EMBO J*, vol. 17, n° 10, pp. 2865-2876.
- Nishioka K, Chuikov S, Sarma K, Erdjument-Bromage H, Allis CD, Tempst P, Reinberg D (2002).** Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes Dev*, vol. 16, n° 4, pp. 479-489.
- Niwa H, Abe K, Kunisada T, Yamamura K (1996).** Cell-cycle-dependent expression of the STK-1 gene encoding a novel murine putative protein kinase. *Gene*, vol. 169, n° 2, pp. 197-201.
- Nonaka N, Kitajima T, Yokobayashi S, Xiao G, Yamamoto M, Grewal SI, Watanabe Y (2002).** Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat Cell Biol*, vol. 4, n° 1, pp. 89-93.
- Ohsumi K, Katagiri C, Kishimoto T (1993).** Chromosome condensation in *Xenopus* mitotic extracts without histone H1. *Science*, vol. 262, n° 5142, pp. 2033-2035.
- Petersen J, Paris J, Willer M, Philippe M, Hagan IM (2001).** The *S. pombe* aurora-related kinase Ark1 associates with mitotic structures in a stage dependent manner and is required for chromosome segregation. *J Cell Sci*, vol. 114, n° 24, pp. 4371-4384.
- Preuss U, Landsberg G, Scheidtmann KH (2003).** Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase. *Nucleic Acids Res*, vol. 31, n° 3, pp. 878-885
- Prigent C, Gill R, Trower M, Sanseau P (1999).** *In silico* cloning of a new protein kinase, Aik2, related to *Drosophila* Aurora using the new tool: EST Blast. *In Silico Biol*, vol. 1, n° 2, pp. 123-128.
- Raich WB, Moran AN, Rothman JH, Hardin J (1998).** Cytokinesis and midzone microtubule organization in *Caenorhabditis elegans* require the kinesin-like protein ZEN-4. *Mol Biol Cell*, vol. 9, n° 8, pp. 2037-2049.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000).** Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, vol. 406, n° 6796, pp. 593-599.
- Reich A, Yanai A, Mesilaty-Gross S, Chen-Moses A, Wides R, Motro B (1999).** Cloning, mapping, and expression of *ial*, a novel *Drosophila* member of the Ipl1/aurora mitotic control kinase family. *DNA Cell Biol*, vol. 18, n° 7, pp. 593-603.

- Rice JC, Nishioka K, Sarma K, Steward R, Reinberg D, Allis CD (2002).** Mitotic-specific methylation of histone H4 Lys 20 follows increased PR-Set7 expression and its localization to mitotic chromosomes. *Genes Dev*, vol. 16, n° 17, pp. 2225-2230.
- Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998).** DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, vol. 273, n° 10, pp. 5858-5868.
- Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999).** Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, vol. 146, n° 5, pp. 905-916.
- Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000).** Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*, vol. 275, n° 13, pp. 9390-9395.
- Roghi C, Giet R, Uzbekov R, Morin N, Chartrain I, Le Guellec R, Couturier A, Doree M, Philippe M, Prigent C (1998).** The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci*, vol. 111, n° 5, pp. 557-572.
- Romano A, Guse A, Krascenicova I, Schnabel H, Schnabel R, Glotzer M (2003).** CSC-1: a subunit of the Aurora B kinase complex that binds to the survivin-like protein BIR-1 and the incenp-like protein ICP-1. *J Cell Biol*, vol. 161, n° 2, pp. 229-236.
- Roth SY, Allis CD (1992).** Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Biochem Sci*, vol. 17, n° 3, pp. 93-98.
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001).** Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem*, vol. 70, pp. 81-120.
- Saka Y, Sutani T, Yamashita Y, Saitoh S, Takeuchi M, Nakaseko Y, Yanagida M (1994).** Fission yeast *cut3* and *cut14*, members of a ubiquitous protein family, are required for chromosome condensation and segregation in mitosis. *EMBO J*, vol. 13, n° 20, pp. 4938-4952.
- Salvador LM, Park Y, Cottom J, Maizels ET, Jones JC, Schillace RV, Carr DW, Cheung P, Allis CD, Jameson JL, Hunzicker-Dunn M (2001).** Follicle-stimulating hormone stimulates protein kinase A-mediated histone H3 phosphorylation and acetylation leading to select gene activation in ovarian granulosa cells. *J Biol Chem*, vol. 276, n° 43, pp. 40146-40155.
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T (2002).** Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, vol. 419, n° 6905, pp. 407-411.
- Sassone-Corsi P, Mizzen CA, Cheung P, Crosio C, Monaco L, Jacquot S, Hanauer A, Allis CD (1999).** Requirement of Rsk-2 for epidermal growth factor-activated phosphorylation of histone H3. *Science*, vol. 285, n° 5429, pp. 886-891.

**Sauvé DM, Anderson HJ, Ray JM, James WM, Roberge M (1999).** Phosphorylation-induced rearrangement of the histone H3 NH<sub>2</sub>-terminal domain during mitotic chromosome condensation. *J Cell Biol*, vol. 145, n° 2, pp. 225-235.

**Sawin KE, LeGuellec K, Philippe M, Mitchison TJ (1992).** Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature*, vol. 359, n° 6395, pp. 540-543.

**Schmiesing JA, Gregson HC, Zhou S, Yokomori K (2000).** A human condensin complex containing hCAP-C-hCAP-E and CNAP1, a homolog of *Xenopus* XCAP-D2, colocalizes with phosphorylated histone H3 during the early stage of mitotic chromosome condensation. *Mol Cell Biol*, vol. 20, n° 18, pp. 6996-7006.

**Schmitt A, Gutierrez GJ, Lenart P, Ellenberg J, Nebreda AR (2002).** Histone H3 phosphorylation during *Xenopus* oocyte maturation: regulation by the MAP kinase/p90Rsk pathway and uncoupling from DNA condensation. *FEBS Lett*, vol. 518, n°s 1-3, pp. 23-28.

**Schumacher JM, Ashcroft N, Donovan PJ, Golden A (1998a).** A highly conserved centrosomal kinase, AIR-1, is required for accurate cell cycle progression and segregation of developmental factors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development*, vol. 125, n° 22, pp. 4391-4402.

**Schumacher JM, Golden A, Donovan PJ (1998b).** 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*, vol. 143, n° 6, pp. 1635-1646.

**Sciortino S, Gurtner A, Manni I, Fontemaggi G, Dey A, Sacchi A, Ozato K, Piaggio G (2001).** The cyclin B1 gene is actively transcribed during mitosis in HeLa cells. *EMBO Rep*, vol. 2, n° 11, pp. 1018-1023.

**Scrittore L, Hans F, Angelov D, Charra M, Prigent C, Dimitrov S (2001).** pEg2 aurora-A kinase, histone H3 phosphorylation, and chromosome assembly in *Xenopus* egg extract. *J Biol Chem*, vol. 276, n° 32, pp. 30002-30010.

**Segil N, Guermah M, Hoffmann A, Roeder RG, Heintz N (1996).** Mitotic regulation of TFIID: inhibition of activator-dependent transcription and changes in subcellular localization. *Genes Dev*, vol. 10, n° 19, pp. 2389-2400.

**Sen S, Zhou H, White RA (1997).** A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines. *Oncogene*, vol. 14, n° 18, pp. 2195-2200.

**Severson AF, Hamill DR, Carter JC, Schumacher J, 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*, vol. 10, n° 19, pp. 1162-1171.

**Severson AF, Bowerman B (2002).** Cytokinesis: closing in on the central spindle. *Dev Cell*, vol. 2, n° 1, pp. 4-6.

- Shang C, Hazbun TR, Cheeseman IM, Aranda J, Fields S, Drubin DG, Barnes G (2003).** Kinetochore protein interactions and their regulation by the Aurora kinase Ipl1p. *Mol Biol Cell*, vol. 14, n° 8, pp. 3342-3355.
- Sharp DJ, McDonald KL, Brown HM, Matthies HJ, Walczak C, Vale RD, Mitchison TJ, Scholey JM (1999).** The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within interpolar microtubule bundles of *Drosophila* embryonic mitotic spindles. *J Cell Biol*, vol. 144, n° 1, pp. 125-138.
- Shen X, Yu L, Weir JW, Gorovsky MA (1995).** Linker histones are not essential and affect chromatin condensation in vivo. *Cell*, vol. 82, n° 1, pp. 47-56.
- Shibata K, Ajiro K (1993).** Cell cycle-dependent suppressive effect of histone H1 on mitosis-specific H3 phosphorylation. *J Biol Chem*, vol. 268, n° 25, pp. 18431-18434.
- Shindo M, Nakano H, Kuroyanagi H, Shirasawa T, Mihara M, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Yagita H, Okumura K (1998).** cDNA cloning, expression, subcellular localization, and chromosomal assignment of mammalian aurora homologues, aurora-related kinase (ARK) 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 244, n° 1, pp. 285-292.
- Singh PB, Georgatos SD (2002).** HP1: facts, open questions, and speculation. *J Struct Biol*, vol. 140, n°s 1-3, pp. 10-16.
- Smirnov IV, Dimitrov SI, Makarov VL (1988).** Polyamine-DNA interactions. Condensation of chromatin and naked DNA. *J Biomol Struct Dyn*, vol. 5, n° 5, pp. 1149-1161.
- Soloaga A, Thomson S, Wiggin GR, Rampersaud N, Dyson MH, Hazzalin CA, Mahadevan LC, Arthur JS (2003).** MSK2 and MSK1 mediate the mitogen- and stress-induced phosphorylation of histone H3 and HMG-14. *EMBO J*, vol. 22, n° 11, pp. 2788-2797.
- Steeg PS, Palmieri D, Ouatas T, Salerno M (2003).** Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer. *Cancer Lett*, vol. 190, n° 1, pp. 1-12.
- Stern BM (2002).** Mitosis: aurora gives chromosomes a healthy stretch. *Curr Biol*, vol. 12, n° 9, pp. R316-318.
- Strahl BD, Ohba R, Cook RG, Allis CD (1999).** Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in *Tetrahymena*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, n° 26, pp. 14967-14972.
- Strahl BD, Allis CD (2000).** The language of covalent histone modifications. *Nature*, vol. 403, n° 6765, pp. 41-45.
- Sugimoto K, Urano T, Zushi H, Inoue K, Tasaka H, Tachibana M, Dotsu M (2002).** Molecular dynamics of Aurora-A kinase in living mitotic cells simultaneously visualized with histone H3 and nuclear membrane protein importin alpha. *Cell Struct Funct*, vol. 27, n° 6, pp. 457-467.

- Sugiyama K, Sugiura K, Hara T, Sugimoto K, Shima H, Honda K, Furukawa K, Yamashita S, Urano T (2002).** Aurora-B associated protein phosphatases as negative regulators of kinase activation. *Oncogene*, vol. 21, n° 20, pp. 3103-3111.
- Sullivan KF, Hechenberger M, Masri K (1994).** Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J Cell Biol*, vol. 127, n° 3, pp. 581-592.
- Sumara I, Vorlaufer E, Gieffers C, Peters BH, Peters JM (2000).** Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol*, vol. 151, n° 4, pp. 749-762.
- Sun ZW, Allis CD (2002).** Ubiquitination of histone H2B regulates H3 methylation and gene silencing in yeast. *Nature*, vol. 418, n° 6893, pp. 104-108.
- Sutani T, Yuasa T, Tomonaga T, Dohmae N, Takio K, Yanagida M (1999).** Fission yeast condensin complex: essential roles of non-SMC subunits for condensation and Cdc2 phosphorylation of Cut3/SMC4. *Genes Dev*, vol. 13, n° 17, pp. 2271-2283.
- Tanaka TU, Rachidi N, Janke C, Pereira G, Galova M, Schiebel E, Stark MJ, Nasmyth K (2002).** Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell*, vol. 108, n° 3, pp. 317-329.
- Taylor EM, Moghraby JS, Lees JH, Smit B, Moens PB, Lehmann AR (2001).** Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18/Spr18 complex. *Mol Biol Cell*, vol. 12, n° 6, pp. 1583-1594.
- Terada Y, Tatsuka M, Suzuki F, Yasuda Y, Fujita S, Otsu M (1998).** AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis. *EMBO J*, vol. 17, n° 3, pp. 667-676.
- Thatcher TH, Gorovsky MA (1994).** Phylogenetic analysis of the core histones H2A, H2B, H3, and H4. *Nucleic Acids Res*, vol. 22, n° 2, pp. 174-179.
- Thomson S, Clayton AL, Hazzalin CA, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC (1999).** The nucleosomal response associated with immediate-early gene induction is mediated via alternative MAP kinase cascades: MSK1 as a potential histone H3/HMG-14 kinase. *EMBO J*, vol. 18, n° 17, pp. 4779-4793.
- Trivier E, De Cesare D, Jacquot S, Pannetier S, Zackai E, Young I, Mandel JL, Sassone-Corsi P, Hanauer A (1996).** Mutations in the kinase Rsk-2 associated with Coffin-Lowry syndrome. *Nature*, vol. 384, n° 6609, pp. 567-570.
- Tseng TC, Chen SH, Hsu YP, Tang TK (1998).** Protein kinase profile of sperm and eggs: cloning and characterization of two novel testis-specific protein kinases (AIE1, AIE2) related to yeast and fly chromosome segregation regulators. *DNA Cell Biol*, vol. 17, n° 10, pp. 823-833.

**Uemura T, Ohkura H, Adachi Y, Morino K, Shiozaki K, Yanagida M (1987).** DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *S. pombe*. *Cell*, vol. 50, n° 6, pp. 917-925.

**Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, Choo KH (2000).** Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol*, vol. 10, n° 21, pp. 1319-1328.

**Vadlamudi RK, Adam L, Wang RA, Mandal M, Nguyen D, Sahin A, Chernoff J, Hung MC, Kumar R (2000).** Regulatable expression of p21-activated kinase-1 promotes anchorage-independent growth and abnormal organization of mitotic spindles in human epithelial breast cancer cells. *J Biol Chem*, vol. 275, n° 46, pp. 36238-36244.

**van Hooser A, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini MA (1998).** Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci*, vol. 111, n° 23, pp. 3497-3506.

**Waizenegger IC, Hauf S, Meinke A, Peters JM (2000).** Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell*, vol. 103, n° 3, pp. 399-410.

**Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E (2000).** The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. *Oncogene*, vol. 19, n° 42, pp. 4906-4916

**Wang JC (2002).** Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 3, n° 6, pp. 430-440.

**Waring P, Khan T, Sjaarda A (1997).** Apoptosis induced by gliotoxin is preceded by phosphorylation of histone H3 and enhanced sensitivity of chromatin to nuclease digestion. *J Biol Chem*, vol. 272, n° 29, pp. 17929-17936.

**Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD (1999).** Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell*, vol. 97, n° 1, pp. 99-109.

**Wheatley SP, Carvalho A, Vagnarelli P, Earnshaw WC (2001a).** INCENP is required for proper targeting of Survivin to the centromeres and the anaphase spindle during mitosis. *Curr Biol*, vol. 11, n° 11, pp. 886-890.

**Wheatley SP, Kandels-Lewis SE, Adams RR, Ainsztein AM, Earnshaw WC (2001b).** INCENP binds directly to tubulin and requires dynamic microtubules to target to the cleavage furrow. *Exp Cell Res*, vol. 262, n° 2, pp. 122-127.

**Winston F, Allis CD (1999).** The bromodomain: a chromatin-targeting module?. *Nat Struct Biol*, vol. 6, n° 7, pp. 601-604.

**Woollard A, Hodgkin J (1999).** *Stu-7/air-2* is a *C. elegans aurora* homologue essential for chromosome segregation during embryonic and post-embryonic development. *Mech Dev*, vol. 82, n°s 1-2, pp. 95-108.

---

**Yaffe MB, Elia AE (2001).** Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin Cell Biol*, vol. 13, n° 2, pp. 131-138.

**Yamamoto Y, Verma UN, Prajapati S, Kwak YT, Gaynor RB (2003).** Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature*, vol. 423, n° 6940, pp. 655-659.

**Yanai A, Arama E, Kilfin G, Motro B (1997).** Ayk1, a novel mammalian gene related to *Drosophila* aurora centrosome separation kinase, is specifically expressed during meiosis. *Oncogene*, vol. 14, n° 24, pp. 2943-2950.

**Yang XJ, Ogryzko VV, Nishikawa J, Howard BH, Nakatani Y (1996).** A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, vol. 382, n° 6589, pp. 319-324.

**Yoda K, Ando S, Morishita S, Houmura K, Hashimoto K, Takeyasu K, Okazaki T (2000).** Human centromere protein A (CENP-A) can replace histone H3 in nucleosome reconstitution *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 97, n° 13, pp. 7266-7271.

**Zecevic M, Catling AD, Eblen ST, Renzi L, Hittle JC, Yen TJ, Gorbsky GJ, Weber MJ (1998).** Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J Cell Biol*, vol. 142, n° 6, pp. 1547-1558.

**Zeitlin SG, Barber CM, Allis CD, Sullivan KF, Sullivan K (2001a).** Differential regulation of CENP-A and histone H3 phosphorylation in G2/M. *J Cell Sci*, vol. 114, n° 4, pp. 653-661.

**Zeitlin SG, Shelby RD, Sullivan KF (2001b).** CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J Cell Biol*, vol. 155, n° 7, pp. 1147-1157.

**Zhong S, Zhang Y, Jansen C, Goto H, Inagaki M, Dong Z (2001).** MAP kinases mediate UVB-induced phosphorylation of histone H3 at serine 28. *J Biol Chem*, vol. 276, n° 16, pp. 12932-12937.