

Université de Montréal

Régulation de la dégradation de p27^{Kip1} par phosphorylation de la protéine adaptatrice Cks1

Par
Geoffrey Bilon

Département de pharmacologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en pharmacologie

Avril 2006

© Geoffrey Bilon, 2006



W.
4
U58
2006
V.136

100-30-1-10

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Régulation de la dégradation de p27^{Kip1} par phosphorylation de la protéine adaptatrice Cks1

Présenté par
Geoffrey Bilon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Audrey Claing
Président-rapporteur

Dr Sylvain Meloche
Directeur de recherche

Dr Marc Servant
Membre du jury

RÉSUMÉ

L'expression de l'inhibiteur de CDK p27^{Kip1} lors de la transition G1/S du cycle cellulaire est contrôlée par sa dégradation protéolytique impliquant le système ubiquitine-protéasome. Les complexes actifs cycline E-Cdk2 et cycline A-Cdk2 phosphorylent p27 sur la Thréonine 187, ce dernier étant ainsi reconnu et ubiquitiné par le complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2}, en association avec l'adaptateur Cks1. La protéine Cks1 est absente dans les cellules quiescentes et son expression est induite par les facteurs de croissance. De plus, Cks1 est surexprimée dans de nombreux cancers humains tels que les carcinomes pulmonaires et colorectaux. Toutes ces observations soulignent l'importance d'élucider les mécanismes régulant Cks1 au cours du cycle cellulaire. La phosphorylation des protéines régule de nombreux aspects de la progression des cellules en G1/S. Ainsi, dans cette étude, nous avons démontré par marquage métabolique au ³²P et par des cartes phosphopeptidiques en 2D que l'adaptateur Cks1 est phosphorylé *in vivo* sur les sérines 2 et 51. En plus, par mutagenèse dirigée, nous avons déterminé que la perte de ces sites de phosphorylation avait un impact sur l'interaction de Cks1 avec certains de ses partenaires à la transition G1/S, notamment l'ubiquitine ligase E3 Skp2 et l'inhibiteur de CDK p27. Cependant, les mutants non-phosphorylables de Cks1 se comportent de la même façon que la protéine sauvage en ce qui concerne leur interaction avec CDK1 et CDK2. Finalement, la localisation subcellulaire des mutants non-phosphorylables diverge de celle de Cks1 sauvage. En effet, en immunofluorescence, il semble que ces mutants soient séquestrés dans le cytoplasme. Tous ces résultats mettent l'accent sur l'importance de la phosphorylation dans la fonction adaptatrice de Cks1 à la transition G1/S du cycle cellulaire. Ces découvertes ainsi que les travaux futurs viseront à mieux comprendre les mécanismes de régulation de p27 et pourraient paver la voie à l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques impliquées dans la modulation de la croissance cellulaire.

Mots clés : p27^{Kip1}, SCF^{Skp2}, Cks1, dégradation, phosphorylation.

SUMMARY

The expression of the CDK inhibitor p27^{Kip1} during the G1/S transition of the cell cycle is controlled by its proteolytic degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. The phosphorylation of p27 on threonine 187 by the cyclin E-Cdk2 and cyclin A-Cdk2 complexes is a prerequisite to its recognition and subsequent ubiquitination by the ubiquitin ligase SCF^{Skp2}, in association with the adaptor Cks1. The Cks1 protein is absent from quiescent cells, and its expression is induced by growth factors. Moreover, Cks1 is overexpressed in several human cancers, including lung and colorectal carcinomas. All these observations emphasize the importance of elucidating the mechanisms regulating Cks1 during the cell cycle. Protein phosphorylation regulates several aspects of the G1/S transition. Thus, in this study, we have demonstrated by ³²P metabolic labeling and 2D phosphopeptide maps that Cks1 is phosphorylated *in vivo* on serines 2 and 51. Furthermore, by directed mutagenesis, we have determined that the loss of these phosphorylation sites has an impact on the interaction of Cks1 with certain of its partners at the G1/S transition, especially the E3 ubiquitin ligase Skp2 and the CDK inhibitor p27. However, the Cks1 non-phosphorylatable mutants behave the same way as the wild type protein as long as their interaction with Cdk1 and Cdk2 is considered. Finally, the subcellular localization of these mutants diverges from that of wild type Cks1. Indeed, the Cks1 mutant proteins S2A, S51A and especially S2-51A seem to be sequestered into the cytoplasm of the cells. In conclusion, all these results show that the phosphorylation is crucial for the adapter function of Cks1 at the G1/S transition of the cell cycle. These discoveries as well as the future works will be necessary to better understand the mechanisms regulating p27, and could lead to the identification of novel pharmacological targets implicated in the modulation of cell growth.

Keywords: p27^{Kip1}, SCF^{Skp2}, Cks1, degradation, phosphorylation.

TABLES DES MATIÈRES

<i>1. INTRODUCTION</i>	P.1
1.1 Les bases du cycle cellulaire	P.1
1.1.1 Les différentes étapes du cycle cellulaire.....	P.1
1.1.2 Régulation du cycle cellulaire.....	P.3
1.1.2.1 Les complexes cyclines-CDKs.....	P.3
1.1.2.2 Les régulateurs positifs et négatifs du cycle cellulaire.....	P.4
1.1.2.3 Les points de restriction.....	P.7
1.2 L'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1}	P.12
1.2.1 Identification et généralités fonctionnelles.....	P.12
1.2.2 Phénotype de la souris p27 ^{-/-}	P.13
1.2.3 Cinétique et régulations au cours du cycle cellulaire.....	P.15
1.2.4 Implications de p27 ^{Kip1} dans le cancer.....	P.21
1.3 Le système protéolytique ubiquitine-protéasome	P.24
1.3.1 Identification	P.24
1.3.1.1 Mécanismes.....	P.24
1.3.1.2 Implications dans les pathologies humaines.....	P.27
1.3.1.3 Potentiel thérapeutique.....	P.29
1.3.2 Les ligases E3 du cycle cellulaire.....	P.30
1.3.3 Les différentes E3 ligases ciblant spécifiquement le CKI p27 ^{Kip1}	P.36
1.3.3.1 SCF ^{Skp2-Cks1}	P.36
1.3.3.2 KPC.....	P.47

1.4 L'adaptateur du cycle cellulaire Cks1	P.52
1.4.1 Identification et généralités fonctionnelles.....	P.52
1.4.2 Structure.....	P.56
1.4.3 Cinétique d'expression, régulations et localisation subcellulaire.....	P.60
1.4.4 Phénotypes des souris Cks1 ^{-/-} et Cks2 ^{-/-}	P.65
1.4.5 Implications de Cks1 dans le cancer.....	P.68
2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	P.73
3. RÉSULTATS – ARTICLE “ <i>Characterization of two phosphorylation sites on Cks1 in the context of p27^{Kip1} degradation: the serines 2 and 51</i> ”.....	P.74
4. DISCUSSION	P.105
4.1 Cks1 est phosphorylé <i>in vivo</i> sur les sérines 2 et 51	P.105
4.2 Les interactions Cks1-CDK sont phospho-indépendantes	P.110
4.3 Les interactions Cks1-Skp2 et Cks1-p27^{Kip1} sont phospho-dépendantes	P.112
4.4 L'ajout de la sérine 2 n'est pas suffisant pour conférer à Cks2 le potentiel de substituer Cks1 dans son rôle d'adaptateur dans le complexe SCF^{Skp2}	P.115
4.5 Impact de la phosphorylation sur la localisation subcellulaire de Cks1	P.117
4.6 Perspectives de ce projet	P.121
5. CONCLUSION	P.123
6. BIBLIOGRAPHIE	P.125
7. ANNEXES – MODÉLISATION	P.141

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Fonction et cinétique d'activation des différents complexes cyclines-CDKs...P.3

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les quatre phases du cycle cellulaire et le stade G0.....	P.2
Figure 2 : Régulation des complexes cyclines-CDKs au cours du cycle cellulaire.....	P.5
Figure 3 : Points de restriction et mécanismes de surveillance du cycle cellulaire.....	P.7
Figure 4 : Régulation du point de surveillance G1/S.....	P.8
Figure 5 : Régulation du point de surveillance G2/M.....	P.10
Figure 6 : Régulation du point de surveillance métaphase-anaphase.....	P.11
Figure 7 : Gigantisme et organomégalie de la souris p27 ^{-/-}	P.14
Figure 8 : La sous-expression de p27 est associée à une diminution de survie des patientes atteintes de cancer des ovaires.....	P.22
Figure 9 : Le système protéolytique ubiquitine-protéasome.....	P.26
Figure 10 : Le système protéolytique ubiquitine-protéasome est impliqué dans une grande variété de pathologies humaines.....	P.29
Figure 11 : Architecture et composition en sous-unités du complexe ubiquitine ligase APC/C.....	P.32
Figure 12 : Architecture et composition en sous-unités du complexe ubiquitine ligase SCF.....	P.33
Figure 13 : La progression à travers le cycle cellulaire est assurée par l'action concertée de deux familles d'ubiquitine ligase : APC/C et SCF.....	P.36
Figure 14 : Cks1 est essentiel pour l'ubiquitination de p27 par SCF ^{Skp2}	P.41
Figure 15 : Structure cristallographique du complexe Skp1-Skp2-Cks1-p27 ^{Kip1}	P.42
Figure 16 : Détails de l'interface d'interaction Skp2-Cks1.....	P.43
Figure 17 : Détails de l'interaction entre p27 phosphorylé sur la Thr187 et l'interface Skp2-Cks1.....	P.45
Figure 18 : Modèle du complexe macromoléculaire E2-SCF ^{Skp2} -Cks1-p27 ^{Kip1} -Cdk2-cyclineA.....	P.47

Figure 19 : La régulation de la stabilité de p27 ^{Kip1} au cours du cycle cellulaire est assurée en grande partie par l'activité séquentielle de deux complexes ubiquitine ligases : KPC en G1 et SCF ^{Skp2-Cks1} en S ainsi que G2.....	P.50
Figure 20 : Alignement des séquences primaires des protéines Cks de divers organismes eucaryotes.....	P.53
Figure 21 : Structure cristallographique de hCks1.....	P.60
Figure 22 : Cinétiques d'expression des différents partenaires de Cks1 dans la dégradation de p27 à la transition G1/S du cycle cellulaire.....	P.61
Figure 23 : Schéma reflétant le mécanisme de séquestration FRS2-dépendant régulant l'activité de Cks1 dans le noyau.....	P.64
Figure 24 : La petite taille caractéristique des souris Cks1 ^{-/-}	P.66
Figure 25 : Accumulation de p27 et cycline E dans les MEFs Cks1 ^{-/-}	P.67
Figure 26 : Surexpression de Cks1 dans des tissus tumoraux de poumon.....	P.69
Figure 27 : La surexpression de Cks1 est associée avec un temps de survie diminué lorsque p27 est bas chez des patients atteints de carcinomes colorectaux.....	P.70
Figure 28 : Myc5-Cks1 WT s'exprime à des niveaux plus bas que Myc6-Cks1 WT dans des NIH3T3, et à des niveaux comparables dans des HEK293.....	P.106
Figure 29 : Le mutant S9A, à la différence des mutants non-phosphorylables de Cks1, ne lie pas la kinase CDK2.....	P.111
Figure 30 : Comparaison des séquences primaires d'acides aminés des protéines homologues hCks1 et hCks2.....	P.115
Figure 31 : La localisation subcellulaire de la protéine Cks1 exogène n'est pas influencée par la taille de l'épitope en N-terminal.....	P.117

N.B. : Cette liste ne comprend pas les figures de l'article qui se trouvent à la section 3 du mémoire (résultats).

LISTE DES SIGLES

Å : Angstrom

APC/C: Anaphase Promoting Complex / Cyclosome

ATM: Ataxia telangiectasia-mutated

ATP: Adenosine triphosphate

ATR: ATM and Rad3-related

BrdU : 5-bromo-2-deoxyuridine

CAK: Cdk activating kinase

cAMP: Cyclic AMP

CASH: Carbohydrate interacting

CCRE: Cell cycle regulatory element

Cdc: Cell division cycle

Cdh1: Cdc20 homolog 1

Cdk: Cyclin-dependent kinase

cDNA: Complementary DNA

CFTR: Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator

ChIP: Chromatin immunoprecipitation

Chk: Checkpoint kinase

CIP: Cdk interacting protein

CKI: Cdk inhibitor

Cks1: Cdk subunit 1 = Cdc kinase subunit 1

Cks2: Cdk subunit 2

CRM1: Chromosomal region maintenance 1

DDB1: Damaged-DNA binding protein 1

DDCP: DNA damage checkpoint

DEAE: Diethylaminoethyl

DUB: Deubiquitinating enzyme

eIF4E: Eucaryotic initiation factor 4E

Emi1: Early mitotic inhibitor 1

Erk3: Extracellular signal regulated kinase 3

EST: Expressed sequences tag

FGF: Fibroblast growth factor

FGFR: Fibroblast growth factor receptor

FoxM1: Forkhead box M1

FRS2: Fibroblast growth factor receptor substrate 2

GBDR1: Glioblastoma cell differentiation related 1

GFP: Green fluorescent protein

GST: Glutathion-S-transferase

HA: Influenza hemagglutinin tag

HECT: Homologous with the E6-AP C-terminus

HEK: Human embryonic kidney

hnRNP: Heterogenous nuclear ribonucleoprotein

IC₅₀: Inhibitory concentration 50%

INK4: Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4

IRES: Internal ribosome entry site

IRS1: Insulin receptor substrate 1

Jab1: c-Jun activation domain binding protein 1

K_d : Dissociation constant

KIP: Kinase inhibitory protein

KIS: Kinase interacting stathmin

KPC: Kip1 ubiquitination promoting complex

LRR: Leucine-rich repeat

Mad2: Mitotic arrest deficient 2

MAPK: Mitogen activated protein kinase

MCP: Mitotic checkpoint

MEF: Murine embryonic fibroblast

mRNA: Messenger RNA

NEDD: Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated

NES: Nuclear export signal

NIPA: Nuclear interaction partner of ALK

NLS: Nuclear localization signal

NO: Nitric oxide

NPA60: Nuclear-pore associated protein 60

ORF: Open reading frame

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PDGF: Platelet derived growth factor

PI3K: Phosphoinositide-3 kinase

PKB: Protein kinase B

Rb: Retinoblastoma

Rbx1: RING-box protein 1

RCP: Replication checkpoint

RNAi: RNA interference

RSK: p90 ribosomal protein S6 kinase

SCF: Skp1-cullin1-Fbox protein

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

shRNA: Short hairpin RNA

siRNA: Small interfering RNA

Skp1: S-phase kinase associated protein 1

Skp2: S-phase kinase associated protein 2

Suc1: Suppressor of Cdc2

TGF-beta: Transforming growth factor beta

TUNEL: Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling

UBA: Ubiquitin-associated

Ubc: Ubiquitin conjugating enzyme

UBL: Ubiquitin-like

UTR: Untranslated region

UV: Ultraviolet

VSMC: Vascular smooth muscle cell

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*

C. elegans : *Caenorhabditis elegans*

D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

S. pombe : *Schyzosaccharomyces pombe*

X. laevis : *Xenopus laevis*

En souvenir de mes chers grand parents,

à mes chers parents,

et à tous ceux et toutes celles qui ont un jour souffert du cancer.

REMERCIEMENTS

Je remercie :

- le Docteur Sylvain Meloche pour m'avoir donné la chance de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire, pour son soutien moral, et pour m'avoir dirigé d'une façon exemplaire
- le Docteur et amie Geneviève Rodier pour m'avoir encadré au laboratoire telle une mère (!), étant toujours à mon écoute, et me soutenant quoi qu'il arrive
- Philippe Coulombe pour ses conseils expérimentaux, et son travail de modélisation
- Christian Charbonneau pour son aide en microscopie
- mes amis et amies du laboratoire, Mathieu Arcand, Isabelle Claveau, Paul Déléris, François Duhamel, Justine Rousseau, Marc Saba-El-Leil, Laure Voisin, Catherine Julien, Sylvia Lehmann, Kim Levesque, Christelle Boutonnet, et Stéphanie Grzesiak
- les membres du département de Pharmacologie pour leur gentillesse
- la FES pour m'avoir octroyé des bourses d'excellence au cours de ma maîtrise
- les membres du jury, le Docteur Audrey Claing et le Docteur Marc Servant, pour avoir accepté de prendre le temps de corriger mon mémoire
- mon frère de laboratoire, Benjamin Turgeon, pour son amitié et pour les grands moments que nous avons passés ensemble !
- ma famille, en particulier mes parents Georges et Chantal, mon frère Aurélien, ma marraine Véronique ainsi que mon oncle Michel, pour m'avoir soutenu durant toutes mes études, et pour avoir cru en moi
- mon amour Audrey qui a égayé ma vie durant ces deux ans de maîtrise, et qui, je l'espère, continuera à le faire durant toute ma vie.

1. INTRODUCTION

1.1 Les bases du cycle cellulaire

1.1.1 Les différentes étapes du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le terme attribué au mécanisme moléculaire permettant la division cellulaire. Cette dernière consiste en la division d'une cellule mère en deux cellules filles, chacune d'elles possédant exactement le même bagage génétique que la cellule d'origine. La division cellulaire peut être considérée comme la base de la vie puisqu'elle permet aux eucaryotes unicellulaires (ex. levure) de se reproduire, et aux eucaryotes pluricellulaires (ex. l'homme) de passer d'une simple cellule à un organisme pluricellulaire complexe. Le cycle cellulaire et sa régulation, étudié depuis le début des années 1960, se révèle être un des champs les plus complexes et prometteurs de la biologie moderne.

Le cycle cellulaire peut se diviser essentiellement en quatre phases majeures, chacune d'elles possédant ses caractéristiques propres en termes de fonction et de mode de régulation. Trois de ces phases, G1, S et G2, constituent ce que l'on appelle l'interphase du cycle cellulaire. La quatrième phase est l'étape proprement dite de division cellulaire ou mitose (Fig.1).

La première phase du cycle cellulaire, appelée phase G1, est l'étape qui suit immédiatement la dernière division mitotique. Durant cette phase, en vue d'accéder à l'étape suivante de réplication de l'ADN, les cellules filles nouvellement générées grossissent en taille et intègrent les différents signaux intracellulaires et extracellulaires afin de décider si elles repartent dans le cycle cellulaire ou bien rentrent en quiescence. En effet, si les signaux cellulaires ne sont pas favorables à une réentrée dans le cycle, la cellule peut rentrer en phase G0 ou phase de quiescence, cette dernière étant considérée comme une sortie transitoire ou définitive du cycle cellulaire, dépendamment du contexte cellulaire. Excepté les cellules souches qui se divisent continuellement, la majorité des cellules chez l'adulte humain sont en G0 du fait de leur différenciation. A l'âge adulte, dans la majorité des cas, le cycle cellulaire reste actif juste pour compenser les pertes cellulaires dues à l'apoptose ou bien à des agressions extérieures, et ainsi maintenir un nombre relativement constant de

cellules dans l'organisme. Dans le cas où la cellule se sent prête à accéder à l'étape suivante, une batterie de protéines favorisant la progression en phase G1 et la transition G1/S est activée dans la cellule et l'énergie nécessaire est fournie pour permettre à la cellule de grossir en réponse à une synthèse protéique plus importante et la duplication des organelles. Ainsi, la cellule rentre dans la phase S de l'interphase où son ADN provenant de la cellule mère va être répliqué. Au terme de cette phase, la cellule possède la quantité d'ADN requise pour pouvoir se diviser en deux cellules filles génétiquement similaires durant la phase M. Cependant, avant d'accéder à la mitose, la cellule traverse une autre phase de sécurité appelée G2, durant laquelle la réplication de l'ADN générée en phase S est contrôlée. Dans la mesure où l'ADN répliqué est correcte, et l'environnement favorable, la cellule rentre en mitose pour une nouvelle division et la génération de deux nouvelles cellules filles. La mitose est sans aucun doute la phase du cycle cellulaire la plus complexe et la plus régulée. Cette complexité est mise en évidence par le fait que la mitose se compose de six sous phases appelées dans l'ordre d'apparition : la prophase, la prométaphase, le métaphase, l'anaphase, la télophase et finalement la cytokinèse.

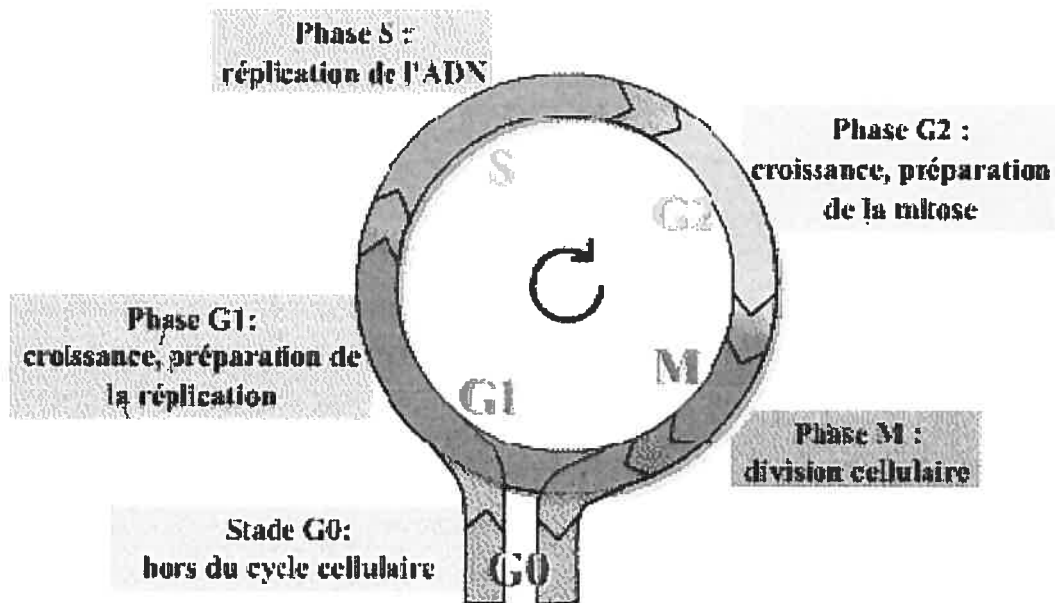


Figure 1: Les quatre phases du cycle cellulaire et le stade G0 (Lebart et Mariani, 2004) – www.snv.jussieu.fr/bmédia/cycleceIIBM).

1.1.2 Régulation du cycle cellulaire

1.1.2.1 Les complexes cyclines-CDKs

Les kinases cycline-dépendante (CDKs), qui sont des sérine-thréonine kinases, sont actives uniquement sous la forme de complexes avec leurs cyclines respectives, ces dernières étant donc leurs régulateurs principaux. Afin que les CDKs soient actives à des étapes bien précises du cycle cellulaire et puissent ainsi activer par phosphorylation des régulateurs clés à ces moments précis, les différentes cyclines ne sont pas exprimées durant tout le cycle cellulaire. En effet, leur cinétique d'expression est caractérisée par des pics d'expression très transitoires durant des phases spécifiques du cycle cellulaire. Essentiellement, le cycle cellulaire est régulé positivement par l'activité séquentielle d'au moins six complexes cyclines-CDKs différents qui interviennent à des moments spécifiques du cycle cellulaire.

Moment du cycle	Complexe Cycline / Cdk	Effets du complexe
G1	Cycline D / Cdk4 et Cycline D / Cdk 6	- Phosphorylent et inactivent la protéine Rb ("Rétinoblastoma protein"), ce qui a pour effet de libérer les facteurs de transcription E2F qui contrôlent l'expression de gènes nécessaires pour la transition G1/S et pour la progression de S (synthèse des cyclines E et A , entre autres).
G1/S	Cycline E / Cdk 2	- Responsable de la transition G1/S. Phosphoryle la protéine Rb . Induit la duplication du centrosome dans certains cas (xénope)
S	Cycline A / Cdk 2	- Phosphoryle des substrats qui déclenchent et entretiennent la réplication de l'ADN et l'inactivation de facteurs de transcription de la phase G1. - Induit la duplication du centrosome chez les mammifères. - Arrêt de la dégradation de la cycline B qui s'accumule.
G2/M	Cycline B / Cdk 1	- Dirige la transition G2/M par phosphorylation de nombreux substrats et conduit la progression de la mitose.

Tableau 1 : Fonction et cinétique d'activation les plus caractérisés des différents complexes cycline-CDK régulant positivement le cycle cellulaire (Lebart et Mariani, 2004 – www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecellIBM).

1.1.2.2 Les régulateurs positifs et négatifs du cycle cellulaire

Les principaux régulateurs positifs du cycle cellulaire sont les cyclines qui s'associent avec les CDKs afin de former des complexes cyclines-CDKs actifs. Ces complexes assurent la progression positive à travers le cycle cellulaire. Cependant, les CDKs peuvent être également régulées positivement par l'intermédiaire d'un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation. En effet, le cycle cellulaire est muni d'une batterie de protéines kinases et phosphatases activatrices. Entre autres, les phosphatases cdc25 A, B et C, ainsi que les kinases CAK («CDK activating kinase» = cyclineH/CDK7) et plk activent différentes CDKs du cycle cellulaire en entraînant des changements de conformation au niveau des deux sites catalytiques des CDKs, ces derniers étant les sites de liaison pour l'ATP et les substrats (Lebart et Mariani, 2004).

En ce qui concerne la régulation négative des complexes cyclines-CDKs, et par conséquent du cycle cellulaire, celle-ci est assurée par l'action concertée de trois types de régulateurs négatifs (Fig.2). Tout d'abord, comme pour la régulation positive, il existe des protéines kinases qui exercent une phosphorylation inhibitrice sur certaines CDKs, comme par exemple les kinases Wee1 et Myt1. Cependant, la majorité de la régulation négative du cycle cellulaire se fait par l'intermédiaire d'une grande famille de protéines inhibitrices appelée les CKIs («CDK inhibitor»). Ces protéines, comme les kinases inhibitrices, agissent sur les complexes cyclines-CDKs en créant des changements de conformation inhibiteurs dans les sites actifs des CDKs. Les CKIs se divisent en deux grandes sous-familles : INK4 («inhibitor of cyclin-dependent kinase 4») et KIP/CIP («kinase inhibitory protein»/«CDK interacting protein»). La sous-famille INK4 se compose de quatre inhibiteurs : p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18^{INK4C} et p19^{INK4D}, ces derniers ayant été décrits comme des protéines interagissant d'une façon inhibitrice avec les CDKs de la phase G1, en d'autres termes CDK4 et CDK6, en bloquant l'accès des CDKs à leur cycline D activatrice. La particularité de ces CKIs est qu'ils sont actifs uniquement en la présence d'une protéine Rb (Rb 110) fonctionnelle, ce qui signifie dans un état hypo-phosphorylé. L'autre famille de CKIs, la sous-famille KIP/CIP, est constituée de trois éléments, en d'autres termes, les inhibiteurs p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} et p57^{KIP2}. Ces inhibiteurs, contrairement aux CKIs INK4 qui agissent en bloquant l'accès aux cyclines, inhibent l'activité des CDKs en formant des

complexes hétérotrimériques inactifs. Les CKIs KIP/CIP ont la particularité de pouvoir inhiber la plupart des complexes cyclines-CDKs; cependant, leur plus grande affinité est pour le complexe cycline E/CDK2 régulant la transition G1/S du cycle cellulaire. Essentiellement, les protéines p21, p27 et p57 peuvent freiner les phases G1, S et G2 du cycle cellulaire ainsi que les transitions G1/S et G2/M. De plus, l'inhibiteur p21 a la caractéristique de pouvoir bloquer directement la réplication de l'ADN, et par conséquent la phase S, en interagissant avec la protéine PCNA, cette dernière étant une protéine accessoire facilitant le travail de l'ADN polymérase delta lors de la réplication et la réparation de l'ADN (Lebart et Mariani).

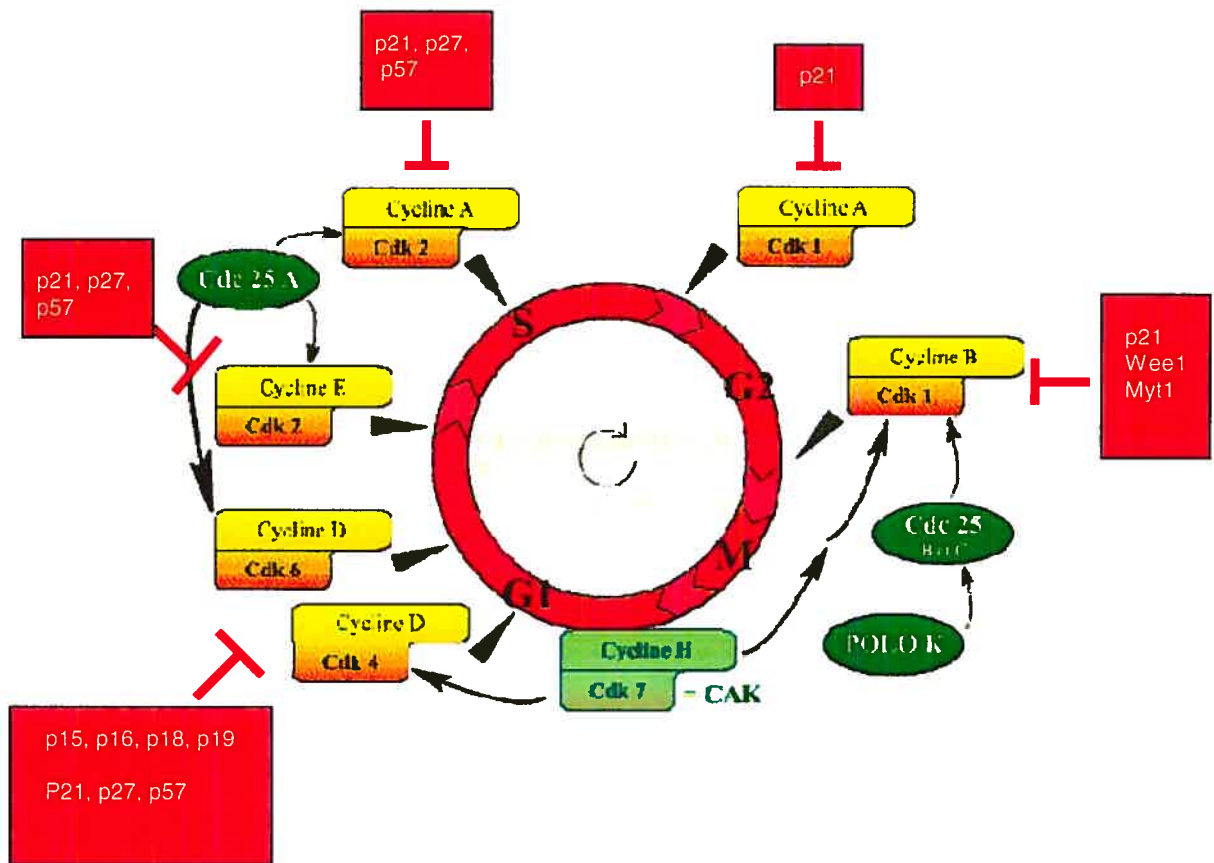


Figure 2 : Régulation des complexes cyclines-CDKs au cours du cycle cellulaire (adapté de Lebart et Mariani, 2004 – www.snv.jussieu.fr/bmedia/cycleceIIBM).

Finalement, en plus des kinases inhibitrices et des CKIs, le cycle cellulaire est pourvu d'un troisième mécanisme de régulation négative assuré par une famille de protéines ayant des

propriétés de suppresseurs de tumeurs. Bien que ces protéines ont pour rôle majeur de bloquer toute prolifération cellulaire anarchique, celles-ci, à la différence des deux autres catégories d'inhibiteurs du cycle cellulaire, n'agissent pas directement sur les complexes cyclines-CDKs gouvernant la progression à travers le cycle. En effet, les suppresseurs de tumeurs tels que p53 et Rb contrôlent le cycle cellulaire en régulant directement ou indirectement la transcription de gènes essentiels au cycle cellulaire. En d'autres termes, ces protéines jouent le rôle de facteurs de transcription ou bien séquestrent d'autres facteurs de transcription. Dans le rôle du maintien de l'intégrité génomique et de l'inhibition de la croissance cellulaire, p53 est sans aucun doute l'élément central de ce dispositif de surveillance cellulaire. A juste titre, cette protéine est considérée comme «le gardien du génome»(Lee and Bernstein, 1993). Lorsqu'une cellule est soumise à des agressions extérieures telles que des radiations UV, ou à des agents génotoxiques, et que par conséquent, elle subit des dommages considérables à l'ADN, p53 est induit par divers mécanismes de surveillance cellulaire. p53 joue alors son rôle de facteur de transcription en activant l'expression de gènes essentiels à l'inhibition de la prolifération cellulaire. L'un des gènes cibles les plus importants de p53 est le CKI de la famille KIP/CIP p21, ce dernier étant un inhibiteur puissant du cycle cellulaire. Ainsi, l'activation de p53 cause l'augmentation de l'expression de p21, ce qui résulte en un arrêt du cycle cellulaire en G1 ou G2 (Bunz et al., 1998; el-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993). Cependant, en plus d'activer des gènes impliqués dans l'inhibition du cycle cellulaire tels que p21, p53 a également le potentiel d'induire des gènes pro-apoptotiques tels que Bax ou Fas, ces derniers conduisant à la mort cellulaire programmée dans le cas où les dommages causés à l'ADN sont trop importants pour être réparés par la cellule.

Un autre suppresseur de tumeur essentiel à la régulation du cycle cellulaire est la protéine appelée Rb pour rétinoblastome, une pathologie développée chez des individus ayant perdu les deux allèles de ce gène. L'activité de pRB dans la régulation du cycle cellulaire dépend en grande partie de son état de phosphorylation. En effet, alors qu'une forme hypo-phosphorylée de cette protéine joue son rôle d'inhibiteur de la progression du cycle cellulaire en G0/G1, la forme hyper-phosphorylée au début de la phase S et des autres phases du cycle n'a plus de potentiel de répression du cycle cellulaire. Ceci est dû au fait que la forme hypo-phosphorylée de pRB en phase G0/G1 a le pouvoir de séquestrer

physiquement la famille de facteurs de transcription E2F, et par conséquent de les inhiber dans leur rôle pro-cycle cellulaire. Cependant, suite à des signaux mitogéniques au cours de la phase G1, les complexes cyclines-CDKs de cette phase hyper-phosphorylent pRB, ce qui cause la libération des facteurs de transcription E2F, ces derniers pouvant alors jouer leur rôle dans la progression du cycle cellulaire en induisant la transcription de gènes essentiels à la transition G1/S et à la phase S, comme par exemple les cyclines de la phase S (Buchkovich et al., 1989; Chen et al., 1989; DeCaprio et al., 1989).

1.1.2.3 Les points de restriction

Au long du cycle cellulaire, il y a trois points de restriction majeurs permettant à ce mécanisme d'être rigoureux et d'éviter ainsi la division potentielle de cellules anormales, ce qui pourrait mener à des cas d'aneuploïdie ou de mutations génétiques. Ces points de contrôle du cycle cellulaire ont lieu à la transition G1/S avant la réplication de l'ADN, à la transition G2/M avant la mitose, et finalement durant la division cellulaire, et plus précisément entre la métaphase et l'anaphase (Fig.3). Même si ces points de restriction sont placés à des endroits précis du cycle cellulaire comme les transitions entre les phases, les mécanismes de surveillance, eux, sont actifs tout au long du cycle, et aident au bon déroulement de ce mécanisme moléculaire en vérifiant l'intégrité de l'ADN avant, pendant et après la réplication (DDCP = DNA Damage Checkpoint), la qualité de la réplication juste avant l'entrée en mitose (RCP = Replication Checkpoint), et finalement le bon positionnement des chromosomes sur la plaque métaphasique en vue d'une ségrégation correcte des chromatides sœurs entre les deux cellules fille (MCP = mitotic checkpoint).

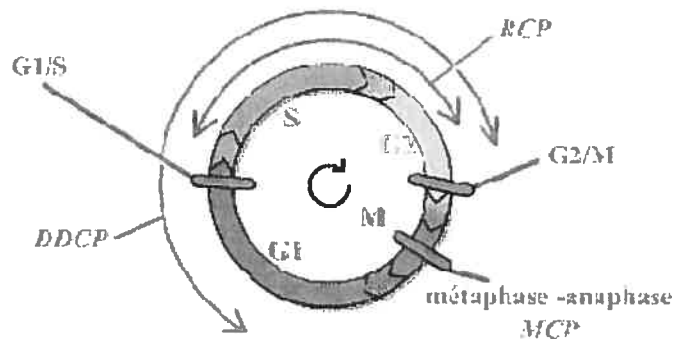


Figure 3 : Points de restriction et mécanismes de surveillance du cycle cellulaire (Lebart et Mariani, 2004 – www.snv.jussieu.fr/bmedia/cycleceIIBM).

Le point de surveillance G1/S a pour objectif principal de bloquer l'entrée en phase S à une cellule ayant des anomalies au niveau de ses molécules d'ADN. Pour ce faire, ce point de restriction repose sur deux voies de signalisations visant à inhiber les complexes cyclines-CDKs de la phase G1, mais surtout les complexes cyclines-CDKs permettant l'entrée en phase S, autrement dit les complexes cyclines E/A-CDK2 (Fig.4). La première voie de signalisation a pour finalité la dégradation de la phosphatase cdc25A, qui, dans des conditions normales, déphosphoryle et par conséquent active les CDKs 4 et 2 essentiels à l'entrée en phase S. Cette voie est activée par des protéines reconnaissant des cassures dans l'ADN. Une fois liées à l'ADN endommagé, ces protéines recrutent ATM qui active à son tour la kinase Chk2. Le résultat de cette activation est l'hyperphosphorylation de la phosphatase cdc25A qui est par la suite ciblée pour sa dégradation via le système ubiquitine-protéasome. Le deuxième mécanisme sur lequel repose le point de surveillance G1/S est l'induction du suppresseur de tumeur p53 suite à des lésions de l'ADN. Ce dernier active le CKI p21 qui inhibe les complexes cycline D-CDK4 et cycline E/A-CDK2, ce qui cause l'arrêt du cycle en G1. En plus de ces deux mécanismes principaux, la régulation de la transition G1/S est également assurée par l'activité inhibitrice d'autres CKIs, tels que p27 et p57.

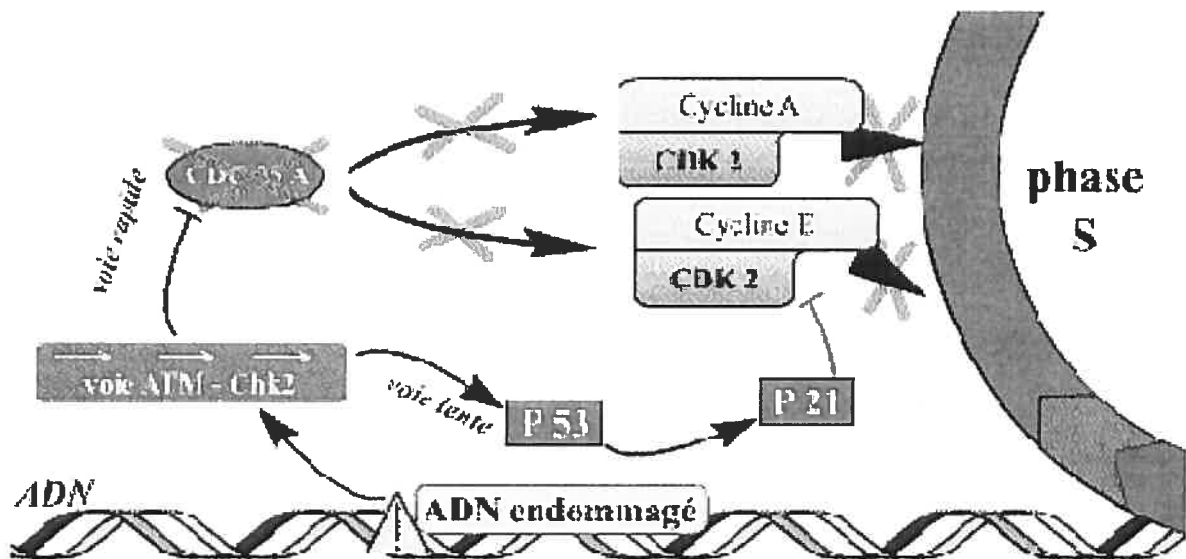


Figure 4 : Régulation du point de surveillance G1/S (Lebart et Mariani, 2004 – www.snv.jussieu.fr/bmedia/cycleceIIBM).

Le point de restriction à la transition G2/M du cycle cellulaire est crucial puisqu'il refuse l'entrée en mitose à des cellules possédant des anomalies dans leurs molécules d'ADN, ou n'ayant pas terminé leur cycle de réplication. Ainsi, ce point de surveillance évite la génération de cellules fille possédant un bagage génétique erroné, ce qui pourrait éventuellement mener à des cellules caractérisées par une instabilité génétique, et source potentielle de développement tumoral. Afin de causer un arrêt en phase G2, ce point de restriction vise, par l'intermédiaire de deux grandes voies de signalisation, à inactiver le complexe cycline-CDK à l'origine de l'entrée en mitose, autrement dit le complexe cyclineB-CDK1 (Fig.5). L'une des cibles principales de ce système de surveillance est la phosphatase cdc25C qui, normalement, déphosphoryle et active la kinase CDK1. La voie de signalisation à l'origine de l'inactivation de cette phosphatase dépend des kinases chk1 et chk2. En effet, suite à des brisures au niveau de l'ADN, les kinases chk1 et chk2 deviennent actives et phosphorylent cdc25C, qui se voit par la suite séquestrée dans le cytoplasme, et par conséquent inactive en terme de régulation du cycle cellulaire. chk1 et chk2 peuvent également bloquer cdc25C en interférant avec l'activité de la kinase plk qui active par phosphorylation cette phosphatase. En plus de cdc25C, une autre cible de la voie ATM-ATR-chk1-chk2 est la kinase CDK1, qui se voit inactivée dû à une séquestration du complexe cycline B-CDK1 dans le cytoplasme. La deuxième voie de signalisation responsable de l'arrêt en G2 est dépendante du suppresseur de tumeur p53. En effet, lorsque p53 est induit, il entraîne la surexpression de p21, ce dernier inhibant non seulement le complexe cycline B-CDK1 mais également la kinase CAK. p53, en plus d'activer la transcription de certains gènes inhibiteurs du cycle cellulaire, peut inhiber l'expression d'autres gènes impliqués dans l'entrée en mitose, tels que les gènes codant pour CDK1 ou encore la cycline B.

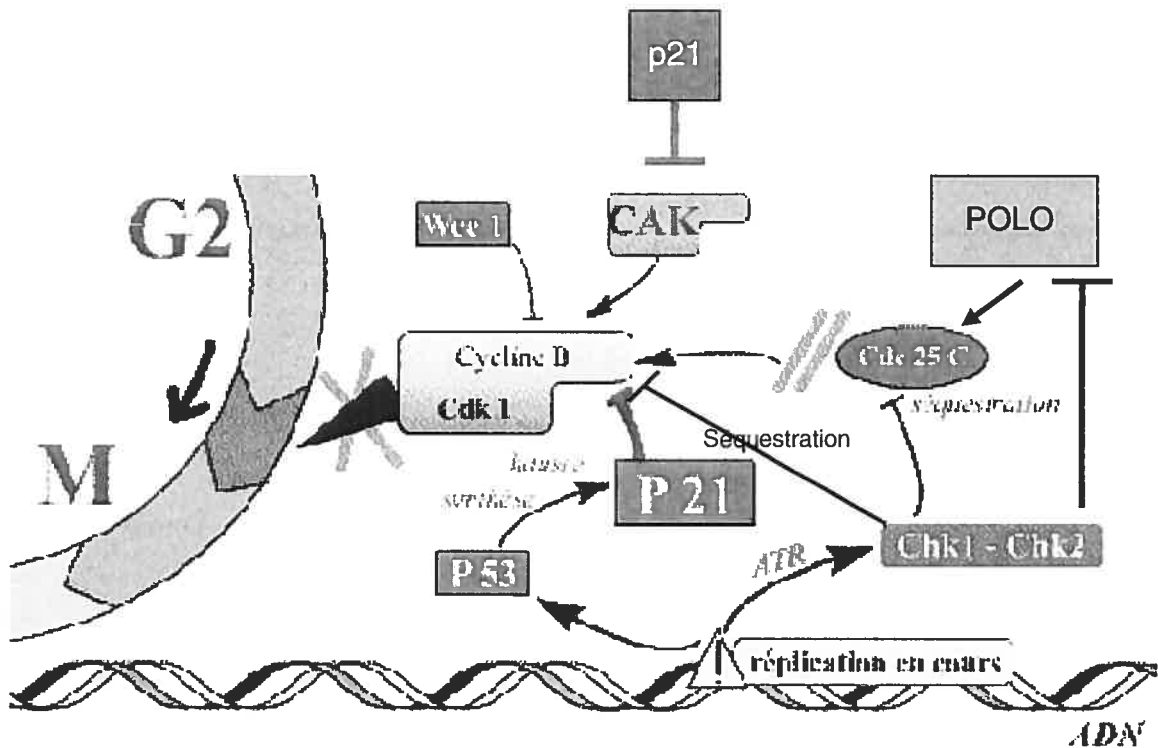


Figure 5: Régulation du point de surveillance G2/M (Lebart et Mariani, 2004 – www.snv.jussieu.fr/bmedia/cycleceIIBM).

Finalement, le point de surveillance métaphase-anaphase est la défense ultime de la cellule contre les divisions cellulaires anormales puisqu'il constitue le dernier point de restriction du cycle cellulaire et qu'il a lieu au milieu de la mitose (Fig.6). Ce mécanisme de surveillance a pour but de bloquer la cellule en métaphase jusqu'à ce que tous les chromosomes présents à la plaque métaphasique soient correctement attachés au fuseau mitotique via leur kinétochores, et ceci en vue d'une ségrégation correcte des chromatides sœurs entre les deux cellules fille. Sur l'ensemble des chromosomes, un seul kinétochore mal attaché est suffisant pour déclencher un signal d'arrêt métaphasique. Ce signal négatif correspond en fait à l'activation de la protéine Mad2 (Mitotic Arrest Deficient 2) qui inhibe le complexe ubiquitine ligase APC^{Cdc20} par contact physique. Lorsque cette E3 ligase est active, elle entraîne la dégradation de la sécurine, ce qui cause l'activation de la protéase séparase, et par la suite, la dégradation de la cohésine qui, normalement, permet aux deux chromatides sœurs d'un même chromosome d'être assemblées. Ainsi, en inhibant le

complexe APC^{Cdc20}, ces signaux négatifs dus aux kinétochores mal attachés permettent le maintien des chromatides sœurs et par conséquent, l'arrêt de la mitose en métaphase.

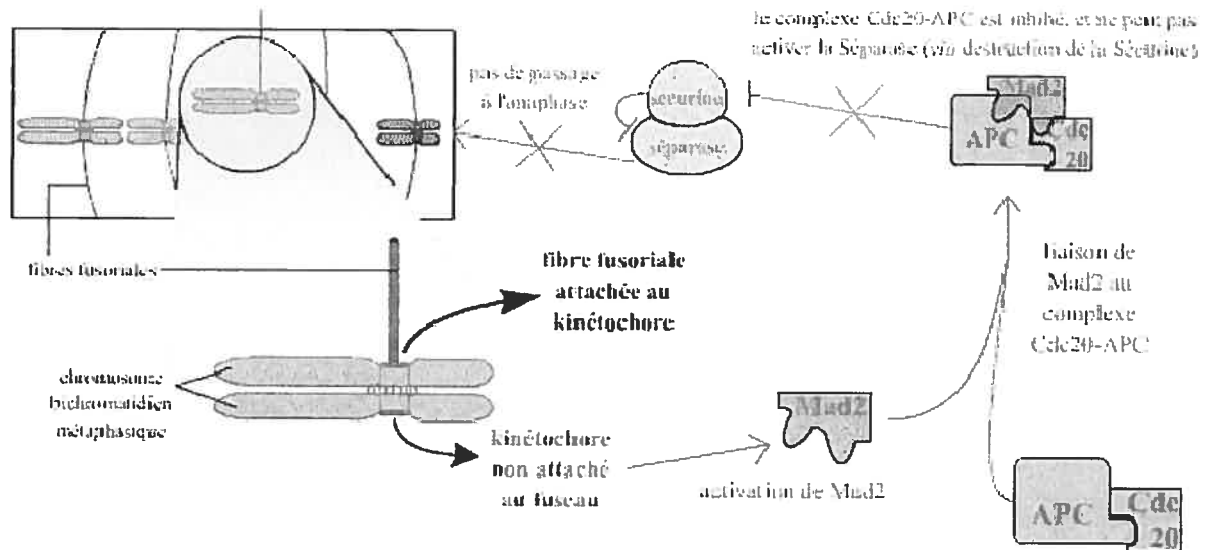


Figure 6 : Régulation du point de surveillance métaphase-anaphase (Lebart et Mariani, 2004 – www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecelIBM).

Les nombreux régulateurs positifs et négatifs, ainsi que les différents points de surveillance font du cycle cellulaire un mécanisme moléculaire très fiable, dont les erreurs sont rares. Cependant rare ne veut pas dire inexistant, et par conséquent, le cycle cellulaire peut être le siège de réplication de l'ADN ou de divisions anormales, ce qui peut engendrer des problèmes à l'échelle cellulaire, mais également de l'individu. De plus, un mécanisme d'une haute complexité est en général également très fragile, et c'est le cas du cycle cellulaire. En effet, sachant le très grand nombre de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, et considérant qu'elles peuvent toutes être mutées et rendues non-fonctionnelles, les dérégulations du cycle cellulaire menant au développement tumoral ne sont malheureusement pas rares.

1.2 L'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1}

1.2.1 Identification et généralités fonctionnelles

L'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1} fait partie de la famille CIP/KIP de CKIs (CDK inhibitor), ces derniers étant impliqués dans la régulation négative du cycle cellulaire en inhibant les différents complexes cyclines-CDKs responsables de la progression à travers le cycle. Ce CKI de 27 KDa a été identifié et cloné en 1994 dans des cellules épithéliales de poumon arrêtées suite à un traitement avec le facteur de croissance TGF- β (Transforming Growth Factor beta) (Polyak et al., 1994a; Polyak et al., 1994b; Slingerland et al., 1994), ainsi que dans des cellules Hela arrêtées par l'effet du lovastatin (Hengst et al., 1994). Un ADNc de p27^{Kip1} a été également isolé par la méthode du double hybride chez la levure, en utilisant la cyclineD1 comme appât (Toyoshima and Hunter, 1994). Chez l'humain, le gène p27^{Kip1} est localisé au niveau du bras court du chromosome 12, à la frontière 12p12 – 12p13.1 (Ponce-Castaneda et al., 1995), cette région étant caractérisée par des délétions et des réarrangements chromosomiques dans des leucémies (Chan et al., 1992; Decker et al., 1990). D'un point de vue structural, cette protéine de 198 acides aminés contient essentiellement un domaine d'inhibition des complexes cycline-CDK au niveau de son N-terminal, ce dernier étant conservé dans p21^{Cip1} et p57^{Kip2}, un domaine de liaison pour Jab1, un signal de localisation nucléaire (NLS), et finalement un phosphodégradon C-terminal impliqué dans sa dégradation protéolytique par le complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2-Cks1} (Viglietto et al., 2002).

Bien que p27^{Kip1} lie et inhibe les complexes cycline-CDK contenant les cyclines D, E et A, sa cible principale demeure le complexe cyclineE-CDK2, ce dernier étant essentiel à la transition G1/S du cycle cellulaire (Sherr and Roberts, 1999; Vidal and Koff, 2000). En plus d'avoir la capacité d'inhiber l'activité de complexes cycline-CDK en formant des complexes hétérotrimériques inactifs (Russo et al., 1996), p27^{Kip1} peut également interférer stériquement avec la phosphorylation activatrice des CDKs par la kinase CAK (Aprelikova et al., 1995; Kato and Ogawa, 1994; Polyak et al., 1994b). Ainsi, l'expression ectopique de p27 cause l'arrêt du cycle cellulaire en G1 du fait de l'inhibition des complexes CDK2-cycline E/A (Polyak et al., 1994b; Toyoshima and Hunter, 1994). En effet, l'augmentation de la quantité de complexes CDK2-p27 est une caractéristique des cellules quiescentes

(Millard et al., 1997). D'un autre côté, son inhibition supprime la quiescence dans des fibroblastes (Coats et al., 1996; Rivard et al., 1996). On peut donc dire que $p27^{Kip1}$ contrôle l'entrée et la sortie (G0) du cycle cellulaire. La nature stoechiométrique de l'inhibition du cycle cellulaire par p27 suggère que ce CKI fonctionne en établissant un seuil d'inhibition au dessus duquel les CDKs, notamment CDK2, doivent accumuler afin de promouvoir l'entrée dans le cycle. Ainsi, l'entrée dans le cycle cellulaire dépend d'une balance stoechiométrique entre les complexes hétérodimériques cycline-CDK actifs et les complexes hétérotrimériques cycline-CDK-p27 inactifs (Millard et al., 1997). Bien que $p27^{Kip1}$ est reconnu essentiellement pour son activité négative sur le cycle cellulaire et surtout la transition G1/S via l'inhibition des complexes CDK2-cycline E/A, ce CKI peut également réguler positivement la progression à travers le cycle cellulaire en favorisant la stabilisation de cycline D essentielle à la progression en phase G1 (Cheng et al., 1999; Soos et al., 1996). Finalement, hormis son activité nucléaire sur les complexes cycline-CDK, $p27^{Kip1}$, suite à son export nucléaire, peut également contrôler dans le cytoplasme des fonctions cellulaires CDK-indépendantes, telles que la migration cellulaire (Nagahara et al., 1998). Plus précisément, il a été montré que p27 est impliqué dans la motilité cellulaire en interférant avec les voies de signalisation RhoA-dépendantes (Besson et al., 2004).

1.2.2 Phénotype de la souris $p27^{-/-}$

L'un des phénotypes les plus flagrants de la souris $p27^{-/-}$ correspond à sa grosse taille comparée aux souris contrôle (Fig.7A). En effet, cette augmentation de taille de 20 à 30% est due à l'hyperprolifération de nombreux tissus, ceci menant à une hyperplasie dans différents organes, ou, en d'autres termes, une organomégalie généralisée (Nakayama et al., 1996). Les organes les plus touchés par cette hyperprolifération sont ceux caractérisés par la plus forte expression de $p27^{Kip1}$. Cette corrélation positive est vraie pour le thymus (Fig.7B), l'hypophyse, les glandes surrénales, les testicules et les ovaires (Nakayama et al., 1996). Ainsi, cette organomégalie généralisée caractérisant les souris $p27^{-/-}$ confirme le rôle majeur de $p27^{Kip1}$ dans la prolifération cellulaire.

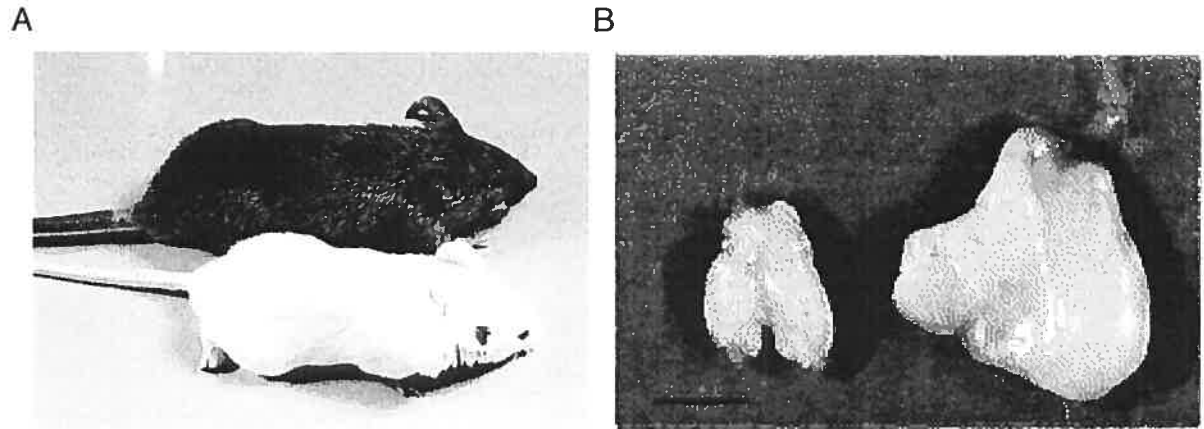


Figure 7 : A. Différence de taille après 12 semaines entre la souris noire $p27^{-/-}$ et la souris blanche sauvage. B. Hyperplasie du thymus chez la souris $p27^{-/-}$ (à droite) versus la souris sauvage (à gauche). L'échelle correspond à 5mm (Nakayama et al., 1996).

La notion que $p27^{\text{Kip1}}$ est le CKI essentiel responsable du contrôle de la croissance cellulaire à la transition G1/S est renforcée par le fait que les souris $p21^{-/-}$ et $p57^{-/-}$ ne présentent pas le phénotype de dérégulation du cycle cellulaire observé chez les souris $p27^{-/-}$ (Nakayama et al., 2001). Cette hyperprolifération cellulaire ne cause pas nécessairement une dysfonction des organes touchés. Cependant, les souris femelles $p27^{-/-}$ sont stériles dû à un problème d'ordre prolifératif au niveau du développement des ovaires. De plus, l'organisation des différentes couches cellulaires au niveau de la rétine est perturbée chez ces souris $p27^{-/-}$, et ceci est dû essentiellement à une hyperprolifération de la couche de photorécepteurs (Nakayama et al., 1996). D'un point de vue moléculaire, dans les souris $p27^{+/+}$, l'expression de $p27$ est moins importante que dans les souris sauvages. Cette variation d'expression suggère une expression dose-dépendante des allèles du gène $p27$ (Nakayama et al., 1996). De plus, dans les souris $p27^{-/-}$, l'activité de CDK2 est très élevée, environ dix fois supérieure à celle déterminée dans les souris sauvages contrôle (Nakayama et al., 1996).

En plus de désordres bénins de prolifération, les souris $p27^{+/+}$ et $p27^{-/-}$ sont prédisposées au développement tumoral suite à un traitement avec un carcinogène ou des radiations de type gamma (Fero et al., 1998). Cependant, le phénotype des souris hétérozygotes est intermédiaire à celui des souris $p27^{-/-}$ en terme de développement induit de tumeurs. Ainsi, $p27$ semble être haplo-insuffisant dans son rôle de suppresseur de tumeurs (Fero et al., 1998; Philipp-Staheli et al., 2001). D'un autre côté, d'une façon similaire au souris $Rb^{-/-}$, les

souris $p27^{-/-}$ développent spontanément des tumeurs de l'hypophyse. En effet, à 12 semaines, la moitié des souris $p27^{-/-}$ développent des tumeurs au niveau de cette glande (Nakayama et al., 1996). Cependant, à l'exception de l'hypophyse, les souris $p27^{-/-}$ ne développent quasiment pas de tumeurs spontanément, comparé aux souris sauvages contrôle. Ainsi, il est possible que $p27$, malgré son rôle essentiel dans la différenciation et la prolifération cellulaire, ne soit juste qu'un suppresseur de tumeurs faible d'un groupe très restreint de types cellulaires. En d'autres termes, la perte de $p27$ uniquement ne fournit pas la base essentielle à la prolifération de la plupart des types cellulaires.

D'un autre côté, le fait que $p27$ soit le CKI essentiel à la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire est remis en cause par deux observations. Tout d'abord, des fibroblastes primaires (MEFs) provenant de souris $p27^{-/-}$ grossissent uniquement en présence de sérum, ceci pouvant suggérer une redondance dans les mécanismes de régulation du cycle cellulaire (Fero et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996; Nakayama et al., 1996). De plus, d'une façon surprenante, l'arrêt du cycle cellulaire en G1 suite à un traitement avec du TGF bêta, de la rapamycine, ou une inhibition de contact demeure intact dans les MEFs $p27^{-/-}$. Ceci met en évidence un chevauchement fonctionnel potentiel en terme de régulation de l'entrée dans le cycle, ou alors une caractéristique $p27$ -indépendante des voies de signalisation impliquées dans l'arrêt en G1 suite à l'action de ces trois différents stimuli (Nakayama et al., 1996). Dans cette idée de mécanismes compensatoires, le groupe de Roberts a montré que p130, un protéine de la famille Rb, est capable de réguler l'activité des complexes cyclinE/A-Cdk2 d'une façon normale dans des cellules n'exprimant pas $p27$ et $p21$ (Coats et al., 1999). Cependant, il peut exister plusieurs types d'inhibition de contact, et il est possible que $p27$ soit impliqué dans une inhibition de contact ayant lieu plus tard dans le développement de la souris, au moment du contrôle de la taille des organes, ce mécanisme n'étant pas utile durant l'embryogenèse du fait de la croissance très rapide de l'embryon (Nakayama et al., 1996).

1.2.3 Cinétique et régulations au cours du cycle cellulaire

À la différence de $p21^{Cip1}$ qui est induit lorsque les cellules rentrent dans le cycle cellulaire (Macleod et al., 1995), $p27^{Kip1}$ est présent à des niveaux maximales dans des cellules quiescentes en G0, et diminue rapidement à la transition G1/S suite à des signaux

mitogéniques jusqu'à être quasiment indétectable en phase S (Agrawal et al., 1995; Poon et al., 1995). En effet, parmi tous les régulateurs du cycle cellulaire, p27^{Kip1} est celui qui subit le plus de changements en concentration à la transition G1/S (Nakayama et al., 2001). Ces grandes variations d'expression soulignent l'importance de p27 dans le contrôle du cycle cellulaire.

Au cours du cycle cellulaire, la régulation de p27 est très complexe. En effet, l'abondance de ce CKI est régulée au niveau de la transcription du gène (Dijkers et al., 2000; Medema et al., 2000; Servant et al., 2000), de la traduction de l'ARNm (Agrawal et al., 1996; Millard et al., 2000; Millard et al., 1997; Servant et al., 2000), et finalement par protéolyse de la protéine (Pagano et al., 1995). Essentiellement, les cellules quiescentes et les cellules exposées à certains signaux anti-mitogéniques ou de différenciation, tels que l'inhibition de contact, la privation de sérum, TGF bêta, rapamycine, ou encore l'AMPc sont caractérisées par de hauts niveaux de p27 (Kato et al., 1994; L'Allemain et al., 1997; Polyak et al., 1994b). D'un autre côté, des signaux mitogéniques causés par l'action de facteurs de croissance tels que PDGF ou l'ajout de sérum cause une diminution rapide du niveau de p27 à la transition G1/S, ce qui permet l'activation du complexe cycline E-CDK2.

La surexpression des facteurs de transcription de la famille « Forkhead » AFX, FKHR et FKHL-1 cause l'arrêt du cycle cellulaire en G1 d'une façon dépendante de p27, et ceci dans une grande variété de lignées cellulaires, incluant une lignée transformée par Ras, ou encore une lignée ayant perdu le suppresseur de tumeurs P-TEN (Medema et al., 2000). En effet, ces facteurs de transcription induisent l'activation du gène codant pour p27 en se liant au promoteur, et par conséquent causent l'accumulation de cette protéine. Ces protéines de la famille AFX intègrent des signaux provenant des voies PI3K/PKB et Ras/Ral afin de réguler la transcription de p27 au cours du cycle cellulaire. Plus précisément, l'activité de ces facteurs est diminuée suite à leur phosphorylation par la kinase PKB qui entraîne leur séquestration dans le cytoplasme. Ainsi, lorsque PKB est activée, les facteurs AFX sont inhibés par phosphorylation et le niveau de p27 diminue (Medema et al., 2000). Dans cette idée, la transcription du gène p27 peut être réprimée suite à une stimulation par des facteurs de croissance du type PDGF BB, et ceci via la voie PI3K/AKT/Forkhead décrite ci-dessus. En effet, la répression de la synthèse de p27 par PDGF BB est associée avec une diminution marquée de la transcription du gène Kip1 (90% de réduction après juste 2

heures de stimulation), et par conséquent une diminution dans l'accumulation de l'ARNm Kip1 correspondant (Servant et al., 2000). Cette diminution de la transcription de p27 suite à une stimulation peut être causée par la phosphorylation des facteurs de transcription « Forkhead » par la voie PI3K/AKT mais également par des régulateurs négatifs de la transcription, ces derniers étant régulés par des facteurs de croissance. Dans cette idée, la caractérisation de la région 5' en amont du gène *kip1* de souris a suggéré l'existence d'un élément régulateur négatif de la transcription entre les nucléotides -615 et -1609 (Kwon et al., 1996). Ainsi, le contrôle transcriptionnel est un facteur important dans la régulation de la synthèse de p27^{Kip1} au cours du cycle cellulaire.

En plus de la régulation transcriptionnelle, la traduction de l'ARNm de p27 est un autre mécanisme de contrôle important pour déterminer le niveau cellulaire de p27. En effet, bien que l'abondance de p27 oscille énormément au cours du cycle cellulaire, le niveau de son ARNm demeure relativement constant tout au long du cycle, ceci suggérant une prédominance des mécanismes post-transcriptionnels dans la régulation de p27. Tout d'abord, en G0, l'accumulation de p27 est supportée par une augmentation de la quantité de son ARNm dans les polyribosomes, ce qui accélère la vitesse de traduction de l'ARNm codant pour p27 (Millard et al., 1997). Ainsi, l'ARNm de p27 appartient à un petit groupe d'ARN messagers qui interagit plus efficacement avec la machinerie traductionnelle lorsque la cellule se retire du cycle cellulaire (Millard et al., 1997). Il est donc possible que des protéines ribosomales spécifiques aux cellules quiescentes puissent supprimer les structures secondaires présentes sur l'ARNm de p27, et ainsi favoriser en G0 son interaction avec les polyribosomes (Millard et al., 1997). La grande majorité des ARNm eucaryotes est reconnue et traduite par un mécanisme impliquant la reconnaissance d'une structure en 5' de l'ARNm (5'cap) par le facteur d'initiation eIF4E, ce dernier permettant le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S à l'ARNm (Miskimins et al., 2001). Dans les cellules quiescentes, eIF4E est réprimé, ce qui entraîne une diminution globale de la traduction « cap » dépendante. Cependant, paradoxalement, la traduction de l'ARNm de p27 est maximale en G0 (Agrawal et al., 1996; Millard et al., 1997). Ceci s'explique par le fait que la partie 5'UTR (Untranslated Region) de l'ARNm de p27 est impliquée dans un mécanisme de traduction « 5'cap » indépendant, ce dernier ne nécessitant pas l'activité de eIF4E (Miskimins et al., 2001). En effet, il est suggéré que cette région 5'UTR joue le rôle

d'un site d'entrée interne du ribosome (IRES = Internal Ribosome Entry Site) en possédant une région de polypyrimidine et le potentiel de former plusieurs structures secondaires (Attal et al., 1999). L'initiation interne de la traduction est essentielle à la régulation du niveau d'expression de p27, et semble être spécifiquement activée dans les cellules en quiescence (Miskimins et al., 2001). En plus de l'IRES, la région 5'UTR de l'ARNm de p27 possède plusieurs éléments essentiels à la régulation de la traduction de p27 en fonction des phases du cycle cellulaire. Tout d'abord, il existe un motif de 114 nucléotides appelé élément régulateur du cycle cellulaire (CCRE = Cell Cycle Regulatory Element), ce dernier chevauchant avec une ORF courte (Open Reading Frame) et étant composé d'un domaine de type « épingle à cheveux » riche en G/C pouvant potentiellement former plusieurs structures secondaires (Gopfert et al., 2003). Le domaine riche en G/C ainsi que l'ORF courte, ces derniers étant très conservés parmi les vertébrés, sont essentiels à la capacité du CCRE à réguler la traduction de p27 au cours du cycle cellulaire (Gopfert et al., 2003). De plus, la région 5'UTR de l'ARNm de p27 possède une séquence nucléotidique riche en U, cette dernière étant essentielle à la traduction efficace de p27 dans des cellules proliférantes ou en quiescence (Millard et al., 2000). Des signaux anti-mitogéniques peuvent causer l'accumulation de p27 en modifiant des complexes protéiques liés à son ARNm, et ainsi régulant sa traduction. Ainsi, des facteurs, dont la disponibilité dans le cytosol varie en fonction du cycle cellulaire, lient la partie 5'UTR de l'ARNm de p27 via cet élément riche en uracile (Millard et al., 2000). L'un de ces facteurs est HuR, une protéine ayant été impliquée dans la stabilité de l'ARNm, son transport et sa traduction (Millard et al., 2000). Un autre facteur est hnRNP C1 et C2, des protéines impliquées dans la maturation de l'ARNm, et la traduction d'un groupe spécifique d'ARNm exprimé dans les cellules différenciées (Millard et al., 2000). Dans des cellules arrêtées en G1 par un traitement au lovastatin, hnRNP C1 et C2 voient leur mobilité changée, ce qui a été corrélé avec une augmentation de l'expression de p27. Ainsi, le complexe protéique RNP, ce dernier interagissant avec l'élément riche en uracile dans la région 5'UTR de l'ARNm de p27, a le potentiel de réguler la traduction de l'ARNm de p27, et ce complexe peut être une cible potentielle des signaux anti-mitogéniques (Millard et al., 2000). Finalement, la régulation Rho-dépendante de la synthèse de p27 à la transition G0/G1 implique un élément de 300 nucléotides dans la région 3'UTR de l'ARNm de p27, ce dernier réprimant la traduction.

Essentiellement, l'abondance de p27 au cours du cycle cellulaire dépend de la somme de sa synthèse protéique et de sa dégradation protéolytique. À la transition G1/S du cycle cellulaire, p27 diminue drastiquement alors que sa synthèse protéique reste constante (Millard et al., 1997). Ceci suggère une dégradation rapide de ce CKI à cette transition. En effet, l'un des mécanismes post-traductionnels majeurs impliqués dans la régulation de l'expression de p27 au cours du cycle est sa dégradation protéolytique via le système ubiquitine-protéasome (Pagano et al., 1995). À date, deux ubiquitine ligases SCF^{Skp2} et KPC ciblant spécifiquement p27 à différentes phases du cycle cellulaire ont été identifiées, et un troisième mécanisme de dégradation protéolytique dépendant du complexe DDB1-Cul4-COP9/signalosome ciblant entre autres p27 est en cours de caractérisation (voir section 1.3.3 du mémoire) (Bondar et al., 2006; Ganoth et al., 2001; Higa et al., 2006; Kamura et al., 2004; Spruck et al., 2001). La phosphorylation de p27 sur la Thr187 par les complexes cycline E/A-Cdk2 constitue son signal de dégradation et est un prérequis à sa reconnaissance et son ubiquitination par la ligase SCF^{Skp2}, à la différence de KPC (Montagnoli et al., 1999). En plus du système protéolytique ubiquitine-protéasome, un autre mécanisme post-traductionnel est impliqué dans la dégradation de p27 d'une façon dépendante du cycle cellulaire. Il s'agit d'un système protéolytique clivant rapidement le domaine de liaison aux cyclines de p27 en N-terminal au niveau des acides aminés 35 à 40, transformant ainsi p27 en une protéine tronquée de 22 KDa (Shirane et al., 1999). Cet intermédiaire de 22 KDa, ne possédant pas de domaine de liaison aux cyclines, n'a quasiment aucune activité inhibitrice sur la kinase CDK2 (Shirane et al., 1999). Dans ce mécanisme protéolytique ubiquitine-indépendant, p27 est transformé en p22 par l'activité ATP-dépendante du protéasome 26S, et ensuite, cette protéine tronquée est dégradée en plus petits fragments par des protéases du type calpain (Shirane et al., 1999). L'activité du système protéolytique ubiquitine-dépendant est maximale à la transition G1/S et durant la phase S, comparée à G0/G1, permettant ainsi la dégradation rapide de p27 au début de la phase S, et l'activation subséquente des complexes CDK2-cycline E/A (Shirane et al., 1999). Cependant, à la différence du mécanisme protéolytique ubiquitine-dépendant, le rôle physiologique du mécanisme de clivage ubiquitine-indépendant dans la régulation de p27 reste à établir. Ce clivage en N-terminal par le protéasome 26S d'une manière ATP-dépendante et ubiquitine-indépendante a déjà été décrit pour la cycline B1, passant d'un

poids moléculaire de 49 KDa à 42KDa (Tokumoto et al., 1997). Finalement, dans des conditions d'apoptose, il a été montré que la protéolyse caspase-dépendante de p27 en une protéine tronquée de 23 KDa est à l'origine de l'activité anti-apoptotique de ce CKI (Eymin et al., 1999).

En plus de sa régulation transcriptionnelle, traductionnelle, et post-traductionnelle, l'activité de p27 peut être également modulée en fonction de sa localisation subcellulaire. Pour exercer son activité inhibitrice sur les complexes CDK2-cycline E/A, p27 doit être localisé dans le noyau (Orend et al., 1998; Soucek et al., 1998; Tomoda et al., 1999). L'import nucléaire de p27 se fait essentiellement via son NLS localisé en C-terminal (Zeng et al., 2000), ainsi que par son association avec la protéine NPA60 (Nuclear-pore-associated protein 60). Cependant, la phosphorylation sur la sérine 10 est essentielle à la relocalisation cytoplasmique CRM1-dépendante (Chromosomal Region Maintenance 1) de p27 (Rodier et al., 2001). Cette phosphorylation de p27 par la kinase hKIS (human kinase interacting stathmin) est prédominante en G0/G1, et diminue lorsque les cellules approchent la phase S (Boehm et al., 2002; Rodier et al., 2001). Ainsi, cette relocalisation cytoplasmique P-Ser10-dépendante de p27 en G1 peut servir à diminuer l'abondance de p27 dans le noyau jusqu'à un certain seuil où l'activation du complexe CDK2-cyclineE est possible (Rodier et al., 2001). En plus d'être impliquée dans l'export nucléaire de p27, la phosphorylation sur la sérine 10 cause une stabilisation de ce CKI *in vivo* alors qu'elle n'a aucun impact négatif sur la reconnaissance de p27 par le complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2} (Rodier et al., 2001). Étant donné que la protéine « F-Box » Skp2 colocalise avec CRM-1, et interagit avec p27 dans le noyau et le cytoplasme à la différence de p38^{Jab1}, il est possible que Skp2 soit impliquée dans l'export nucléaire CRM-1-dépendant de p27 (Zancai et al., 2005). Cette idée est renforcée par le fait que Skp2 possède plusieurs NES (Nuclear Export Signal) riches en leucine, ce qui pourrait supporter une liaison directe de Skp2 à CRM-1 (Zancai et al., 2005). En plus de la phosphorylation sur la sérine 10, il existe d'autres phosphorylations essentielles à la localisation subcellulaire de p27. En effet, la phosphorylation sur la thréonine 157 par la kinase PKB/Akt cause la rétention cytoplasmique de p27 dans des cellules cancéreuses humaines de sein (Liang et al., 2002; Shin et al., 2002). Cependant, alors que la phosphorylation sur la sérine 10 favorise l'export nucléaire de p27, la phosphorylation sur la thréonine 157 semble interférer avec l'import

nucléaire de p27 (Viglietto et al., 2002). Cette phosphorylation sur Thr157 est minimale en G0, et augmente par deux fois quand la cellule rentre dans le cycle cellulaire (Liang et al., 2002). Finalement, une dernière phosphorylation sur la thréonine 198 par PKB/Akt et RSKs (p90 ribosomal protein S6 kinases) cause la liaison de p27 à la protéine 14-3-3, et par conséquent sa localisation cytoplasmique (Kudo et al., 2005).

Dans des cellules en prolifération, l'inactivation de p27 en G1 a également lieu par séquestration par les complexes cycline D-CDK4/6 (Sherr and Roberts, 1999). En effet, dans certains types cellulaires, la surexpression des cyclines D1 et D2 par c-Myc cause cette séquestration de p27 (Bouchard et al., 1999; Perez-Roger et al., 1999). Finalement, la surexpression de c-Myc peut également induire un facteur résistant à la chaleur, ce dernier liant p27 et bloquant son association avec le complexe cyclineE-CDK2 (Vlach et al., 1996). En conclusion, la régulation très complexe de p27^{Kip1} souligne le rôle potentiel de ce CKI comme une plateforme d'intégration de divers signaux mitogéniques et antiprolifératifs.

1.2.4 Implications de p27^{Kip1} dans le cancer

Bien que la recherche fût intensive afin de découvrir des anomalies moléculaires pouvant modifier le locus du gène p27 humain, aucune aberration majeure de ce gène n'a été reportée (Kawamata et al., 1995; Pietenpol et al., 1995; Ponce-Castaneda et al., 1995). En effet, bien que la perte d'un allèle de p27 ne soit pas rare dans des tumeurs humaines, la mutation du second allèle est très rare (Kawamata et al., 1995; Pietenpol et al., 1995; Ponce-Castaneda et al., 1995). Cependant, la dérégulation de la traduction de l'ARNm de p27 est associée avec une grande variété de cancers humains (Calkhoven et al., 2002). De plus, une perte ou une diminution du niveau d'expression de p27 due à une dérégulation du système ubiquitine-protéasome dégradant spécifiquement ce CKI est observée communément dans de nombreuses tumeurs humaines, et plus précisément dans environ 50% des cancers humains (Slingerland and Pagano, 2000). Cette sous-expression de p27 est souvent causée par une surexpression des sous-unités catalytiques et adaptatrices des différentes ubiquitine ligases dégradant ce CKI, notamment Skp2 et Cks1 (Slingerland and Pagano, 2000). La sous-expression de p27 observée dans de nombreux cancers épithéliaux, tels que le cancer du poumon, gastro-intestinal, du sein, de l'œsophage, de la prostate, des ovaires, du larynx, et de la cavité orale, est associée à une augmentation de la taille des

tumeurs, de leur agressivité ainsi que de leur potentiel d'invasion. De plus, un faible niveau de p27 dans ces cancers épithéliaux corrèle avec une diminution des chances de survie des patients (Fig.8) (Catzavelos et al., 1997; Fan et al., 1999; Masciullo et al., 1999; Mori et al., 1997; Newcomb et al., 1999; Singh et al., 1998; Tan et al., 1997; Tsihlias et al., 1998; Yasui et al., 1997). En effet, dans des cancers épithéliaux gastro-intestinaux, une sous-expression de p27 dans les échantillons tumoraux est associée avec une augmentation du risque de mort de 2.4 à 2.7 fois (Loda et al., 1997).

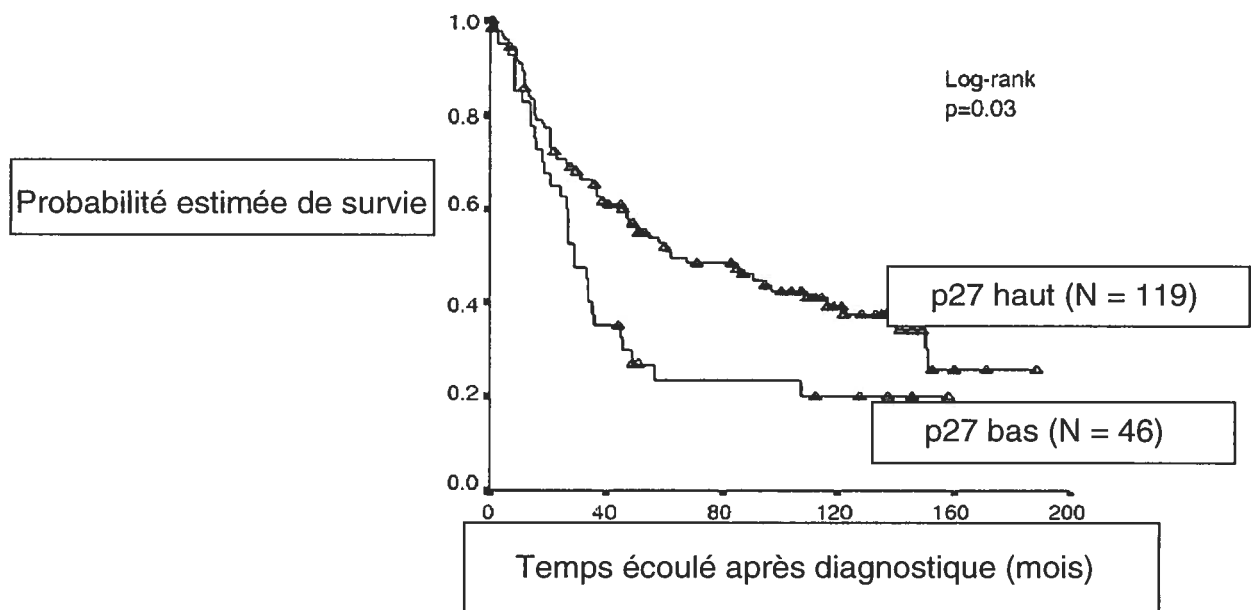


Figure 8 : La sous-expression de p27 est associée à une diminution de survie des patientes atteintes de cancer des ovaires (Schmider-Ross et al., 2006).

De la même manière que les cancers épithéliaux, les cancers du système nerveux central et les lymphomes sont caractérisés par une corrélation inverse entre le niveau de p27 et la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, plus le niveau de p27 est bas, plus les cellules prolifèrent (Chiarle et al., 2000; Mizumatsu et al., 1999; Piva et al., 1999; Piva et al., 1997). Ainsi, p27 se révèle être un marqueur pronostique essentiel dans la caractérisation de ces différents cancers. Du fait de cette valeur pronostique, des méthodes d'immunohistochimie contre p27 sont utilisées de façon routinière dans la caractérisation histologique de nombreux néoplasmes humains (Cariou et al., 1998). Deux mécanismes distincts ont été impliqués dans l'inactivation de p27 dans le processus de carcinogénèse

chez l'humain. Tout d'abord, durant les stades précoces du développement cancéreux, p27 est souvent inactivé suite à son exclusion du compartiment nucléaire et par conséquent sa relocalisation cytoplasmique. En effet, bien que p27 a été décrit initialement comme un antigène nucléaire dans des échantillons tumoraux, de plus en plus, il n'est pas rare de voir une localisation cytoplasmique de p27 dans des tumeurs malignes humaines, telles que les glioblastomes, ou encore les cancers du colon et des ovaires (Ciaparrone et al., 1998; Masciullo et al., 1999; Piva et al., 1999). Ce type de mécanisme d'inactivation est observé en majorité dans des tumeurs précoces encore bien différenciées. Ensuite, durant les stades plus tardifs du cancer, la sous-expression de p27 apparaît (Viglietto et al., 2002). Cependant, les tumeurs caractérisées par une localisation cytoplasmique de p27 se développent via des voies de signalisation différentes de celles utilisées par des tumeurs ayant perdues l'expression de p27 (Viglietto et al., 2002). Finalement, pour restaurer l'activité de p27 chez des patients ayant des tumeurs caractérisées par un faible niveau d'expression de ce CKI, une approche considérée est la thérapie génique directe en utilisant des vecteurs adénoviraux (Katner et al., 2002), ou indirecte en modulant, par des traitements chimiques, les voies de signalisation qui affectent son inactivation ou sa délocalisation cytoplasmique (Sherr and McCormick, 2002). Cependant, l'accumulation induite de p27 peut être néfaste cliniquement, car ceci cause l'arrêt du cycle cellulaire, alors que les chimiothérapies classiques ciblent des cellules en pleine prolifération, en causant des dommages à l'ADN (Blain et al., 2003). Ainsi, la répétition d'entrée et de sortie du cycle cellulaire via une approche anti-cancer appelée chimiothérapie combinatoire pourrait éventuellement permettre à toutes les cellules cancéreuses d'être éliminées.

1.3 Le système protéolytique ubiquitine-protéasome

1.3.1 Identification

1.3.1.1 Mécanismes

En Octobre 2004, le Prix Nobel de chimie a été décerné à Aaron Ciechanover, Avram Hersko, et Irwin Rose pour leur travail dans les années 70 et 80 sur la dégradation des protéines via le système ubiquitine-protéasome. Ceci montre l'importance que donne aujourd'hui la communauté scientifique à ce mécanisme protéolytique, qui régule d'une façon sélective la dégradation de très nombreuses protéines cellulaires aux fonctions variées.

Le mécanisme de dégradation des protéines via le système ubiquitine-protéasome est constitué de deux événements majeurs. La première étape correspond à l'ajout d'un signal de dégradation sur la protéine d'intérêt ; en d'autres termes, une chaîne de polyubiquitine est attachée d'une façon covalente à la protéine cible. Suite à cette modification post-traductionnelle, la protéine est prête pour la deuxième étape, qui n'est autre que sa dégradation protéolytique par le complexe protéasome 26S. Cette dernière étape, par l'intermédiaire de protéines dites de recyclage de l'ubiquitine (deubiquitinating enzymes ou DUBs), génère des molécules d'ubiquitine libres et réutilisables pour de nouvelles dégradations (Ciechanover, 1998). La première étape du processus de dégradation, autrement dit, la conjugaison de molécules d'ubiquitine, un polypeptide de 76 acides aminés très conservé, à la protéine cible s'effectue en trois phases, par l'intermédiaire de trois types d'enzymes appelées E1 ou « ubiquitin-activating enzyme », E2 ou « ubiquitin-conjugating enzyme » et E3, qui correspond à la protéine ubiquitine ligase. Essentiellement, l'enzyme E1 active une molécule d'ubiquitine en formant un intermédiaire thiol-ester de haute énergie E1-S~Ub. L'une des enzymes de conjugaison E2 transfère ensuite le groupement ubiquitine actif de l'enzyme E1 vers la protéine cible qui est liée à une ligase adaptatrice E3 spécifique ou vers l'enzyme E3 pour former un nouveau lien thiol-ester, et ceci toujours via un intermédiaire thiol-ester de haute énergie E2-S~Ub. Cette variation dans l'activité de E2 lors du transfert de l'ubiquitine s'explique par le fait que les deux grandes familles de ligase E3, les E3 à domaine HECT (homologous with the E6-AP C-

terminus) et les E3 contenant un domaine RING, ne fonctionnent pas de la même façon. En effet, contrairement aux E3 RING, les E3 HECT nécessitent la formation d'un troisième intermédiaire thiol-ester de haute énergie E3-S~Ub avant de transférer l'ubiquitine sur leur substrat (Ciechanover, 1998). Quoiqu'il en soit, les protéines ligase E3 jouent un rôle critique dans le système ubiquitine-protéasome puisqu'elles confèrent à ce mécanisme protéolytique sa spécificité de substrats. Cependant, comme on le verra dans un paragraphe suivant sur la dégradation de p27, le niveau de spécificité de ce système est accru par l'activité de certaines protéines telles que des enzymes de modification, en particulier des kinases, ou encore des protéines adaptatrices. Après plusieurs cycles de mono-ubiquitination de la protéine cible, celle-ci possède une chaîne de polyubiquitine qui constitue son signal de dégradation. Dans cette chaîne, les différentes molécules d'ubiquitine sont assemblées d'une façon covalente par l'intermédiaire de liaisons isopeptidiques faisant intervenir majoritairement leur lysine 48.

La chaîne de polyubiquitine présente sur la protéine cible est très rapidement reconnue par le complexe protéasome 26S, ce dernier étant décrit comme une large protéase multicatalytique possédant deux sous-unités, une catalytique appelée le complexe 20S et une autre régulatrice appelée le complexe 19S. La sous-unité régulatrice 19S a pour rôles majeurs de reconnaître et lier les groupements ubiquitine présents sur les protéines cibles, ainsi que de faciliter l'entrée des substrats dans le complexe 20S pour leur protéolyse (Ciechanover, 1998). Toutes les réactions décrites lors des boucles successives de mono-ubiquitination, ainsi que durant la dégradation par le protéasome 26S nécessitent de l'énergie, et par conséquent, consomment de l'ATP. En plus des enzymes d'ubiquitination E1, E2, E3 et du protéasome 26S, ce système protéolytique possède une autre batterie d'enzymes appelée les enzymes de recyclage de l'ubiquitine ou enzymes de déubiquitination DUBs. Ces enzymes moins connues jouent pourtant un rôle crucial dans la protéolyse cellulaire, en étant essentielles lors du désassemblage des chaînes de polyubiquitine, et lors de leur «editing» (Fig.9) (Lam et al, 1997).

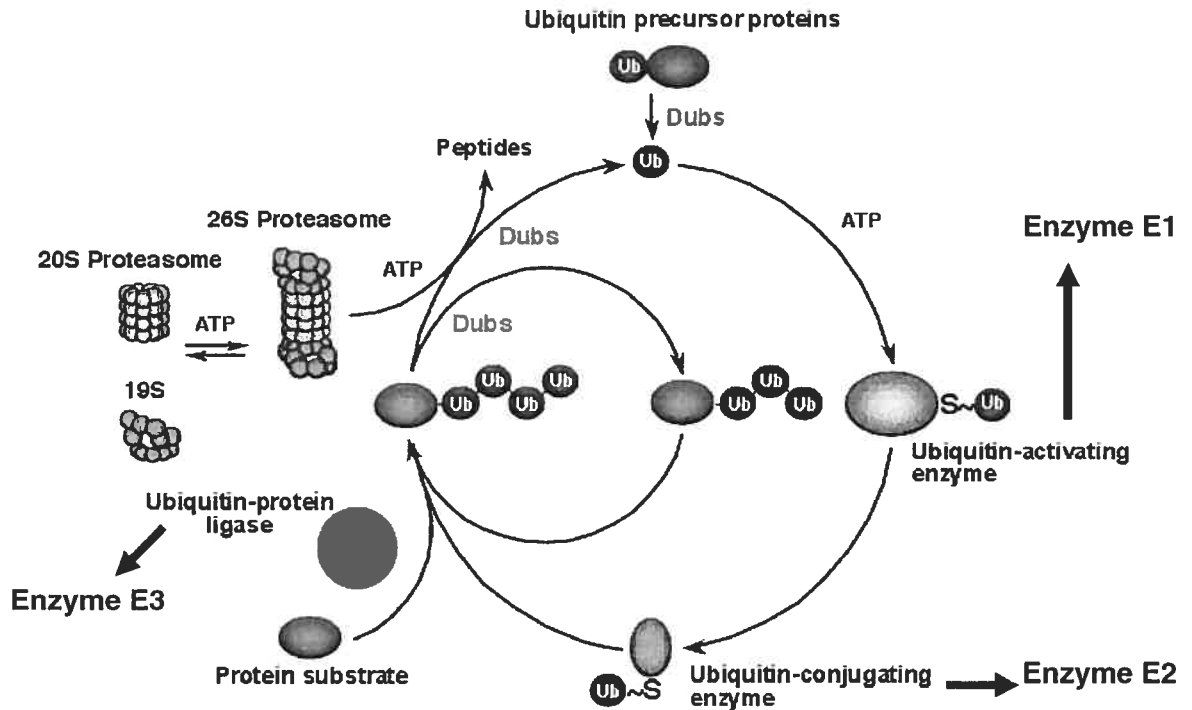


Figure 9: Le système protéolytique ubiquitine-protéasome (Lebart et Mariani, 2004 – www.snv.jussieu.fr/bmedia/cyclecccIBM).

Au cours des dernières années, il a été de plus en plus suggéré que les chaînes de polyubiquitine ne sont pas toujours suffisantes pour assurer la reconnaissance de la protéine cible par le protéasome 26S. En effet, des molécules adaptatrices ou accessoires peuvent être également impliquées dans la reconnaissance de la protéine cible par le protéasome 26S, et plus précisément dans la liaison du substrat au complexe régulateur 19S. Dans cette idée, il a été montré que de nombreuses protéines cellulaires et virales interagissent avec les complexes 20S et 19S du protéasome, en particulier au niveau des ATPases. Ces interactions protéiques peuvent mener à la dégradation des protéines adaptatrices elles-mêmes, ou bien alors à la facilitation de la reconnaissance et dégradation d'autres protéines cellulaires ou virales. Plusieurs exemples peuvent souligner le rôle essentiel de certaines protéines d'échafaudage dans la dégradation de protéines cibles. En effet, la protéine virale E7 du papillomavirus de type 16 interagit spécifiquement avec l'ATPase S4 du complexe 19S du protéasome, et favorise ainsi la dégradation du suppresseur de tumeur Rb (Boyer et

al., 1996). Il en est de même pour l'oncoprotéine cellulaire gankyrine qui interagit avec l'ATPase S6 et augmente ainsi la vitesse de dégradation de Rb (Higashitsuji et al., 2000).

1.3.1.2 Implications dans les pathologies humaines

Le système protéolytique ubiquitine-protéasome, étant impliqué dans la dégradation sélective de nombreuses protéines cellulaires, joue un rôle essentiel dans la régulation de plusieurs mécanismes fondamentaux de la cellule. Parmi eux, on trouve le cycle cellulaire, le développement et la différenciation, les réponses cellulaires au stress, la morphogenèse des réseaux neuronaux, la modulation des récepteurs membranaires, des canaux ioniques et du système de sécrétion, la réparation de l'ADN, la régulation et le « silencing » de la transcription, les réponses immunitaires et inflammatoires, et finalement la synthèse des organelles. En étant impliqué dans la régulation d'autant de mécanismes cellulaires, le spectre de protéines dont la durée de vie est régulée par ce système protéolytique est incroyablement grand. En effet, parmi ces protéines, on compte des régulateurs clés du cycle cellulaire, tels que les cyclines et les CKIs, des suppresseurs de tumeurs, des facteurs de transcription et des répresseurs transcriptionnels, des récepteurs membranaires, et finalement des protéines dénaturées n'ayant pas répondues aux critères d'acceptation du système de contrôle de qualité dans le réticulum endoplasmique. Considérant le spectre de protéines cibles et de mécanismes moléculaires que ce système protéolytique régule, il n'est pas dur à imaginer que des dérégulations de ce mécanisme de dégradation soient à l'origine de nombreuses pathologies humaines (Fig.10).

Les pathologies humaines associées au système ubiquitine-protéasome ont deux origines possibles. Soit la pathologie est due à une perte de fonction du système due à des mutations dans des enzymes de dégradation ou dans des protéines cibles, ce qui cause une stabilisation néfaste de ces protéines cibles ; soit la pathologie est due à un gain de fonction du système menant à une dégradation anormale ou accélérée de certains substrats, dont la sous-expression résultante a des conséquences pathologiques.

Dans le cas des cancers ayant pour origine une dérégulation du système ubiquitine-protéasome, les tumeurs observées peuvent être aussi bien dues à une perte de fonction qu'à un gain de fonction du système de protéolyse. Par exemple, dans certains cancers, des oncogènes puissants tels que c-Myc ou src sont stabilisés dans la cellule à cause d'une perte

de fonction du système ubiquitine, ce qui entraîne une dérégulation du cycle cellulaire, et la transformation tumorale. Essentiellement, la perte de fonction de ce système est souvent provoquée par des mutations dans des sous-unités du complexe ubiquitine ligase ou dans les protéines cibles, ce qui entraîne une diminution ou l'absence d'interaction entre le complexe protéolytique et son substrat. Cependant, la sous expression d'un inhibiteur du cycle cellulaire tels que p27 due à un gain de fonction du système de protéolyse, autrement dit une dégradation accélérée, peut également causer des cancers, ce qui est le cas pour p27 dans de nombreux cancers colorectaux, de la prostate, et du sein (Loda et al., 1997). Dans ces tumeurs, la dégradation incontrôlée de ce CKI est due en grande partie à la surexpression de la protéine F-Box Skp2.

Le syndrome de Liddle, caractérisé par une forte hypertension, est dû à la stabilisation de canaux Na^+ au niveau de la membrane des cellules épithéliales des reins, ce qui cause une réabsorption trop importante de Na^+ et d'eau. Cette stabilisation est due à une perte de fonction du système ubiquitine, et plus précisément de la ligase NEDD4, qui ne peut plus interagir et par conséquent ubiquitiner les canaux sodiques, ces derniers possédant une mutation dans le motif PY reconnu par la ligase (Abriel et al., 1999). La fibrose kystique, qui est une maladie génétique, est une autre conséquence d'un mauvais fonctionnement du système ubiquitine. En effet, lorsque les canaux chlore CFTR possèdent, entre autres, la mutation delta-F 508, bien qu'ils soient fonctionnels, ils n'atteignent pas la surface de la cellule, et ceci est dû à une dégradation trop rapide des canaux chlore mutant (Gelman and Kopito, 2002).

Finalement, les dérégulations du système ubiquitine-protéasome sont également impliquées dans le développement de nombreuses maladies neurodégénératives chroniques, telles que les maladies d'Alzheimer et d'Huntington (Alves-Rodrigues et al., 1998), ou encore dans le mauvais fonctionnement du système immunitaire (Levitskaya et al., 1997).

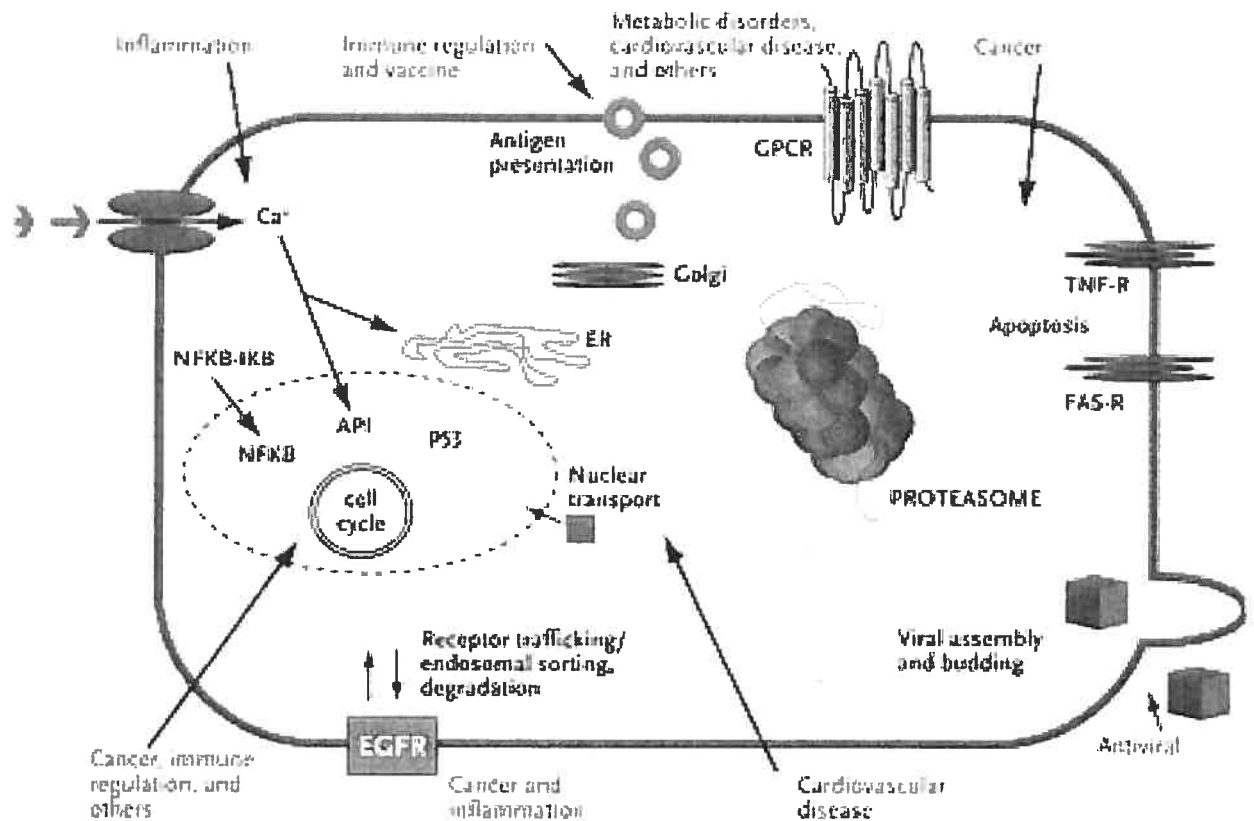


Figure 10 : Du fait de son activité ubiquitaire dans la cellule, le système protéolytique ubiquitine-protéasome est impliqué dans une grande variété de pathologies humaines (The Scientist, Décembre 2005).

1.3.1.3 Potentiel thérapeutique

Du fait que le système ubiquitine-protéasome est impliqué dans la régulation d'une très grande variété de protéines cellulaires, et par conséquent, joue un rôle dans la plupart des mécanismes cellulaires fondamentaux, ce mécanisme protéolytique peut être considéré comme un champ de recherche prometteur pour les compagnies pharmaceutiques car ses dérégulations sont à l'origine d'un grand spectre de pathologies humaines (cancer, maladies neurodégénératives, diabète...), et toutes les classes de protéines appartenant à ce système de protéolyse sont des cibles potentielles pour le développement de médicaments. En effet, les enzymes d'ubiquitination E1, E2, E3, le protéasome 26S, les enzymes de modifications impliquées dans ce système, les protéines adaptatrices ou accessoires, ainsi que les enzymes de déubiquitination sont toutes des protéines à considérer. Alors que la dégradation des protéines via le système ubiquitine

offre déjà un très grand potentiel thérapeutique, d'autres mécanismes utilisant les molécules d'ubiquitine sont aussi prometteurs en ce qui concerne leur potentiel thérapeutique. En effet, la règle du N-terminal d'Alexander Varshavsky, proposant que la demie-vie d'une protéine dépend de l'identité de ses acides aminés en position N-terminal, est également intéressante d'un point de vue thérapeutique car elle pourrait permettre de designer des protéines avec des acides aminés spécifiques en N-terminal, ce qui leur permettraient d'avoir une demie-vie plus adéquate en fonction de la thérapie. Actuellement, sur le marché thérapeutique, l'inhibiteur du protéasome Velcade, développé par la compagnie Millennium, est le seul médicament approuvé ciblant le système ubiquitine-protéasome. Il est utilisé dans les cas de myélomes réfractaires ; cependant, des essais cliniques sont en marche afin de déterminer si cette molécule pourrait être utilisée pour d'autres pathologies. Même si le Velcade est le seul agent thérapeutique sur le marché, la liste des compagnies pharmaceutiques étant au stade des essais cliniques pour des molécules visant la machinerie ubiquitine est très longue. On peut y voir Nereus, Celgene, Progenra, Regeneron, Rigel, Roche, et Novartis. De toutes ces compagnies, Roche semble être la plus en avance avec le développement de petites molécules appelées Nutlines, ayant le potentiel d'inhiber la liaison de la ligase Mdm2 à son substrat p53 (Vassilev et al., 2004).

1.3.2 Les ligases E3 du cycle cellulaire

Bien que les bases du cycle cellulaire et le système protéolytique ubiquitine-protéasome sont connus depuis environ 20 ans, l'idée que ces deux entités soient en relation n'est que très récente. En effet, la première démonstration de leur relation fonctionnelle date de 1991, lorsqu'il a été prouvé que le régulateur positif du cycle cellulaire, la cycline B, était dégradé via le système ubiquitine-protéasome (Glotzer et al., 1991). Depuis, il est reconnu que la régulation du cycle cellulaire est basée sur la dégradation, à des moments précis, de régulateurs clés par ce mécanisme protéolytique.

La progression à travers le cycle cellulaire, comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, nécessite de nombreux régulateurs positifs et négatifs, et une grande partie de ces protéines doivent être actives uniquement durant une période très précise et très courte du cycle cellulaire ; dans le cas contraire, les conséquences pourraient être catastrophiques

pour la cellule. Ainsi, au cours du cycle cellulaire, les cinétiques d'expression des différentes protéines sont régulées minutieusement par le système ubiquitine-protéasome afin que les régulateurs soient exprimés uniquement lorsqu'ils sont fonctionnellement critiques. On peut donc considérer ce système protéolytique comme l'horloge fonctionnelle du cycle cellulaire. Étant donné que les cyclines sont les activateurs principaux des CDKs, afin que ces kinases soient actives durant la bonne période du cycle cellulaire, et que par conséquent, elles phosphorylent les bons substrats, les cinétiques d'expression des différentes cyclines doivent être hautement régulées, et ceci se fait par l'intermédiaire du système ubiquitine. Dans le cas contraire, les CDKs seraient en mesure de phosphoryler des substrats qui ne devraient pas l'être, et ceci serait très dommageable à la cellule. Par exemple, dans des conditions normales, l'expression transitoire de la cycline E à la transition G1/S, ce qui permet l'activation de CDK2, est assurée par la combinaison d'une transcription périodique avec sa déstabilisation dans le complexe actif cycline E-CDK2 par la ligase SCF^{cdc4} (Strohmaier et al., 2001; Won and Reed, 1996). Cependant, dans le cas où la ligase Cdc4 est inactivée dû à une mutation, l'activité de la cycline E persiste au-delà de la transition G1/S, et cette anomalie de régulation due à un mauvais fonctionnement du système de dégradation cause une instabilité chromosomique dans la cellule (Spruck et al., 1999), ce qui entraîne le développement fort probable d'un large spectre de tumeurs (Keyomarsi and Herliczek, 1997).

Essentiellement, le cycle cellulaire est régulé par deux familles de ligases appelées SCF (Skp1-Cullin1-F box protein) et APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome). La plus grande différence entre ces deux familles de ligase est leur mode d'activation. En effet, alors que la famille APC/C est activée par phosphorylation de ses sous-unités centrales (Golan et al., 2002; Kramer et al., 2000; Rudner and Murray, 2000), et par la disponibilité de co-facteurs essentiels à son bon fonctionnement (Fang et al., 1998), la famille SCF est activée suite à des phosphorylations spécifiques de ses substrats. Bien que ces deux ligases du cycle cellulaire n'ont pas du tout le même mode d'activation, elles appartiennent à la même famille fonctionnelle de ligases E3, les ligases possédant un domaine « RING finger ». Ceci est dû au fait que chacune d'elles possède dans son noyau catalytique une protéine du type culline (APC/C2 pour APC/C et Cul-1/Cdc53 pour SCF), ainsi qu'une

protéine contenant un domaine « RING finger » (APC/C11 pour APC/C et Roc1/Rbx1 pour SCF) (Ohta et al., 1999; Zachariae et al., 1998).

Tout d'abord, la ligase APC/C agit au cours du cycle cellulaire, et plus précisément entre la transition métaphase-anaphase et la transition G1/S, par l'intermédiaire de deux formes alternatives, APC/C^{Cdc20} et APC/C^{Cdh1} (Visintin et al., 1997). En effet, la famille de ligase APC/C est constituée d'un noyau catalytique constant composé de 13 sous-unités, ainsi que de deux activateurs Cdc20 et Cdh1, ces derniers contrôlant la spécificité de la ligase (Fig.11).

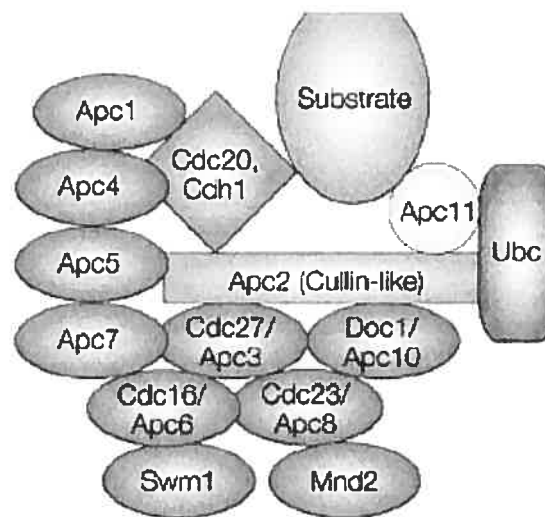


Figure 11 : Architecture et composition en sous-unités du complexe ubiquitine ligase APC/C (Reed, 2003).

Essentiellement, ces deux formes de la ligase APC/C agissent en relais, avec la forme APC/C^{Cdc20} étant impliquée dans la dégradation de substrats mitotiques tels que la sécurine, ceci permettant la transition métaphase-anaphase, et la forme APC/C^{Cdh1} étant impliquée dans la sortie de la phase M en gardant dans un équilibre instable certains des substrats de l' APC/C^{Cdc20} , ainsi que d'autres tels que l'activateur Cdc20 lui-même (Reed, 2003). En plus de permettre la sortie de la mitose, la forme Cdh1 de l'APC/C joue un rôle dans l'inhibition de l'accumulation potentielle de ces substrats mitotiques en phase G1, ce qui serait dommageable à la cellule.

Durant la mitose, une population importante de protéines doit être dégradée rapidement, et ceci d'une façon coordonnée. Ainsi, pour ce faire, le mode d'activation de la ligase APC/C

est totalement adapté puisqu'il permet la dégradation simultanée d'une multitude de substrats mitotiques, suite à une simple activation par phosphorylation de la ligase. Cependant, pour permettre cette dégradation rapide et concertée de plusieurs substrats par la même ligase, ces protéines cibles doivent avoir en commun un motif de liaison reconnue par la ligase. En effet, les substrats des ligases de la famille APC/C contiennent tous des motifs appelés « D-Box » ou « KEN-Box », ces derniers étant reconnus spécifiquement par les ligases de l'APC/C (Pfleger and Kirschner, 2000).

Contrairement aux deux ligases de l'APC/C, les ligases de la famille SCF sont bien plus simples d'un point de vue structural. En effet, une ligase de cette famille est composée uniquement de trois sous-unités et d'une protéine dite « F-Box ». Plus précisément, une molécule d'échafaudage appelée Culline1 sert de pont moléculaire entre la protéine Skp1 (S-phase-kinase-associated protein 1) au niveau de son N-terminal, et les protéines Rbx1 et E2 telles que Ubc2, Ubc4 ou Ubc5, au niveau de son C-terminal. De plus, Skp1, par l'intermédiaire de son domaine de liaison « F-Box », interagit avec la protéine « F-Box », cette dernière donnant la spécificité de substrats à la ligase SCF (Fig.12). Finalement, les protéines « F-Box » interagissent avec leurs substrats spécifiques phosphorylés via des domaines d'interaction protéine-protéine spécifiques tels que LRR (leucine-rich-repeats) (Cardozo and Pagano, 2004).

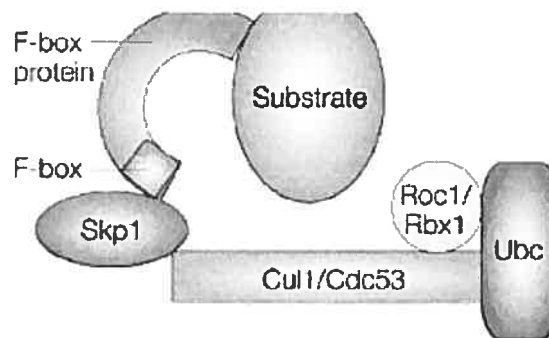


Figure 12: Architecture et composition en sous-unités du complexe ubiquitine ligase SCF (Reed, 2003).

Bien que les ligases SCF soient plus simples que les ligases APC/C d'un point de vue structural, elles sont néanmoins beaucoup plus diverses que les deux formes alternatives de l'APC/C. En effet, cette variété de ligases SCF vient du fait qu'il existe de nombreuses

protéines « F-Box », ces dernières étant classées en trois familles, en fonction de leur domaine d'interaction protéine-protéine en C-terminal. Il existe donc la famille FBW caractérisée par des motifs d'interaction WD-40, la famille FBL avec des motifs LRR, et finalement la famille FBX ayant des motifs plus variés tels que des domaines CASH (carbohydrate interacting), doigt de zinc... (Cardozo and Pagano, 2004). Ainsi, les protéines « F-Box » contiennent deux domaines essentiels à leur fonctionnement. Le premier, en N-terminal, est appelé « F-Box » et permet d'interagir avec le reste de la ligase SCF via Skp1, et le second, en C-terminal, correspond au domaine de liaison de la protéine cible. Ce domaine d'interaction protéine-protéine a pour but de reconnaître un « phosphodégron », ce dernier étant décrit comme une séquence d'acides aminés consensus contenant un groupe phosphate présent avec plus ou moins de conservation sur les différents substrats d'une ligase SCF donnée (Reed, 2003).

À la différence des ligases APC/C qui régulent la dégradation concertée d'une large population de protéines à une période précise du cycle cellulaire, le mécanisme d'activation des ligases SCF permet à ces ligases de supporter le cycle cellulaire à différentes périodes en fonction du contexte de la division cellulaire. En effet, les ligases SCF sont beaucoup plus flexibles en terme d'action car leur activité de dégradation ne dépend pas de leur état de phosphorylation, mais plutôt de la phosphorylation de leurs substrats. Ainsi, l'activité des ligases SCF est contrôlée par la phosphorylation de substrats spécifiques, cette dernière pouvant être régulée très finement, en fonction des phases du cycle cellulaire ou du contexte cellulaire (Reed, 2003).

En étant impliquées dans la régulation de l'expression des différents régulateurs positifs et négatifs classiques de la division cellulaire, ces deux familles de ligase, au mode d'activation bien différent, coordonnent le bon déroulement des différentes transitions du cycle cellulaire (Fig.13). En effet, en phase G1, le maintien de cet état est assuré par la ligase APC/C^{Cdh1} qui cause l'atténuation de l'activité des CDKs 1 et 2 par divers mécanismes. Tout d'abord, cette ligase provoque la dégradation d'une autre ligase impliquée dans la transition G1/S, la ligase SCF^{Skp2-Cks1} (Bashir et al., 2004). Ceci entraîne la stabilisation des CKIs p21 et p27 et l'inhibition subséquente des CDKs 1 et 2. D'un autre côté, afin d'amplifier l'inhibition des CDKs 1 et 2, l'APC/C^{Cdh1} est impliquée également dans la dégradation des cyclines A et B, ainsi que la phosphatase Cdc25A (Cardozo and

Pagano, 2004). La transition G1/S et la progression à travers les phases S et G2 du cycle cellulaire sont assurées par l'action concertée de plusieurs ligases de la famille SCF ainsi que d'un inhibiteur non protéolytique de l'APC/C, Emi1 (Early Mitotic Inhibitor 1). Emi1 inhibe donc l'APC/C^{Cdh1}, ce qui permet à la ligase SCF^{Skp2-Cks1} de dégrader p21, p27 et p130 (Cardozo and Pagano, 2004), et d'activer par conséquent les complexes CDK2/cycline E et CDK2/cycline A essentiels à la transition G1/S et à la progression en phase S. Dans le même temps, les ligases SCF^{béta-Trcp} et SCF^{NIPAA} relaient l'APC/C^{Cdh1} dans la dégradation de cdc25A et cycline B1 respectivement, ce qui prolonge l'inhibition de CDK1 (Bassermann et al., 2005; Cardozo and Pagano, 2004). Durant la transition G2/M, SCF^{Fbw7/Cdc4} dégrade cycline E afin d'atténuer l'activité de CDK2 et d'éviter toute instabilité chromosomique. En parallèle, Emi1 inhibe les 2 formes de l'APC/C et SCF^{béta-Trcp} dégrade Wee1 plutôt que Cdc25A (Cardozo and Pagano, 2004). Ces deux événements causent l'activation de la kinase CDK1 essentielle à l'entrée en mitose. Finalement, au début de la phase M, SCF^{béta-Trcp} dégrade Emi1, ce qui active l'APC/C^{Cdc20} qui va permettre la transition métaphase-anaphase en dégradant la sécurine (Cardozo and Pagano, 2004). L'APC/C^{Cdc20} est impliquée également dans la dégradation des cyclines A et B, afin d'inhiber l'activité de CDK1. Afin de terminer la division cellulaire, l'APC/C^{Cdh1} dégrade l'autre forme de l'APC/C.

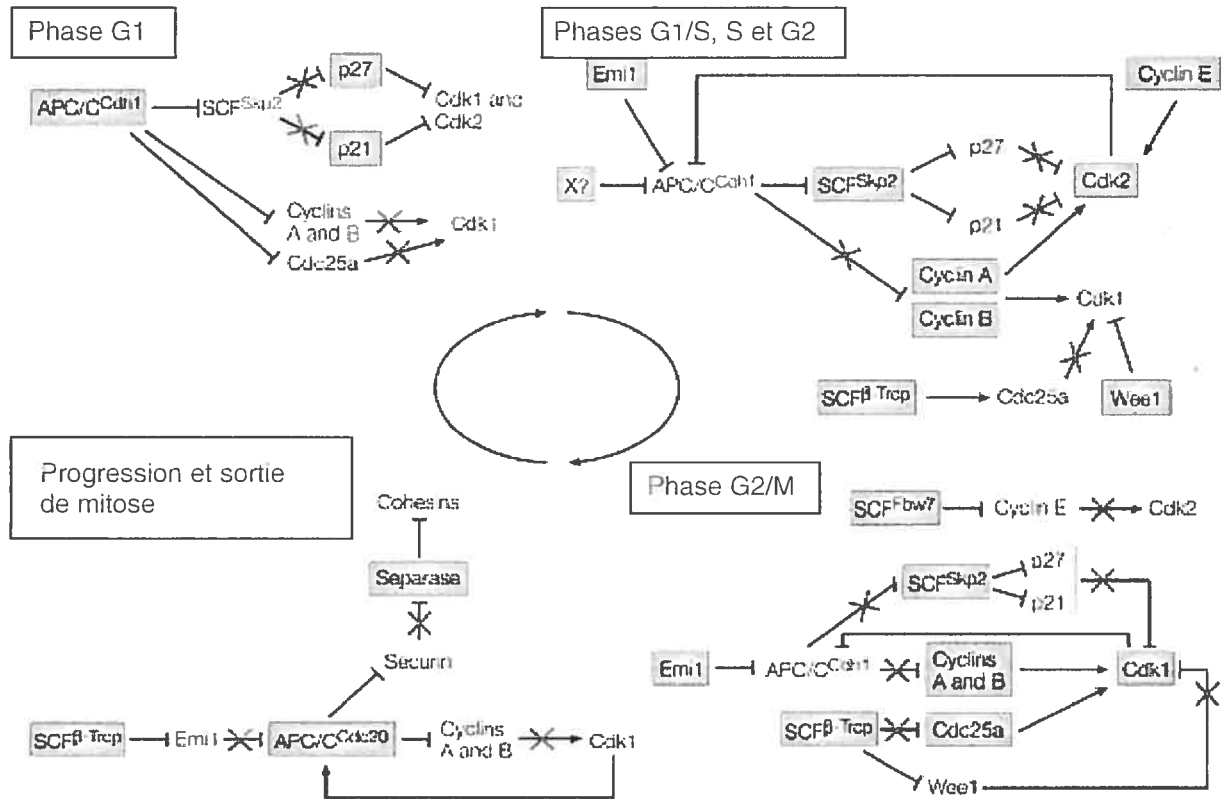


Figure 13 : La progression à travers le cycle cellulaire est assurée par l'action concertée de deux familles d'ubiquitine ligase : APC/C et SCF (Cardozo and Pagano, 2004).

1.3.3 Les différentes E3 ligases ciblant spécifiquement le CKI p27^{Kip1}.

1.3.3.1 SCF^{Skp2-Cks1}

En 1999, Skp2 (S-phase kinases associated protein 2) est identifiée comme la protéine « F-Box » d'un complexe ubiquitine ligase SCF étant à l'origine de la dégradation de p27 d'une manière phospho-dépendante. Ce complexe SCF est alors appelé SCF^{Skp2}. Essentiellement, cette E3 ligase de p27 a été découverte par l'intermédiaire d'expériences de co-immunoprécipitation entre un phosphopeptide de p27, correspondant au C-terminal avec une phospho-thréonine en position 187, et différentes protéines « F-Box » nouvellement découvertes dont Skp2. Ces expériences ont révélé qu'uniquement la protéine « F-Box » Skp2 est capable d'interagir avec ce peptide, et par conséquent avec p27. L'interaction entre ces deux protéines a été confirmée *in vivo*, et le rôle fonctionnel de

Skp2 dans la dégradation de p27 a été prouvé par différents essais d'ubiquitination de p27 *in vitro* et *in vivo* (Carrano et al., 1999).

SCF^{Skp2}, en étant impliquée dans la dégradation de nombreux régulateurs négatifs de la transition G1/S tels que p27^{Kip1}, p57^{Kip2}, p21^{WAF1} et p130, joue donc un rôle crucial dans la transition G1/S, ainsi que dans la progression des cellules à travers les phases S et G2 du cycle cellulaire (Lin and Diehl, 2004). Du fait de son rôle bien spécifique à des moments précis du cycle cellulaire, Skp2 est la seule protéine « F-Box » connue dont l'expression oscille au cours de la division cellulaire. En effet, son expression est négligeable en G0/G1, puis Skp2 commence à s'accumuler tard en G1, et finalement son expression finit par être maximale durant les phases S, G2 et M, en vue de son activité de dégradation (Carrano et al., 1999). Cette cinétique d'expression est régulée par l'action concertée de différents mécanismes moléculaires. Tout d'abord, du point de vue de la régulation transcriptionnelle, le gène codant pour Skp2 est activé en G1/S par le facteur de transcription E2F, mais également par la liaison de la protéine « GA-binding » au promoteur de ce gène (Imaki et al., 2003; Vernell et al., 2003). En ce qui concerne la régulation post-traductionnelle de Skp2, celle-ci est basée sur sa dégradation via le système ubiquitine-protéasome. Le premier mécanisme protéolytique découvert est actif en G0/G1, et consiste en l'auto-ubiquitination de Skp2 au sein même de son complexe SCF, et par conséquent son auto-dégradation (Wirbelauer et al., 2000). Cependant, durant l'année 2004, il a été montré que l'APC/C^{Cdh1} est également un régulateur majeur du niveau d'expression de Skp2 en G0/G1. Ceci a été démontré de deux façons. Tout d'abord, des essais d'ubiquitination *in vitro* de Skp2 induits par l'APC/C^{Cdh1} ont été réalisés. De plus, Bashir et al ont décrit l'accumulation de Skp2 et la déstabilisation subséquente de p27 en G1 suite à un traitement des cellules avec un siRNA dirigé contre Cdh1 (Bashir et al., 2004). Finalement, l'abondance de la protéine Skp2 est diminuée par un troisième mécanisme de protéolyse encore inconnu impliquant p107, ce qui stabilise p27 et retarde l'entrée en phase S de la cellule (Rodier et al., 2005).

A la différence des souris Cull1^{-/-}, les souris Skp2^{-/-} sont viables, en santé et fertiles. Cependant, outre leur petite taille comparée aux souris contrôle due à une diminution de la prolifération à cause de l'accumulation de p27, le phénotype cellulaire le plus flagrant des souris Skp2^{-/-} est la présence de cellules dites « géantes » caractérisées par de gros noyaux

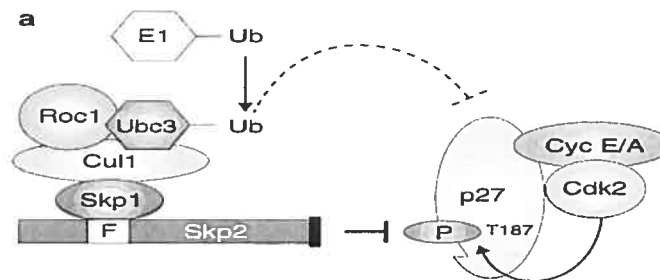
polyploïdes et des centrosomes multiples (Nakayama et al., 2000). Ce phénotype, dû à un phénomène appelé endoreduplication où l'ADN est répliqué plusieurs fois sans aucune mitose, est favorisé par l'absence de Skp2 dans ces cellules (Nakayama et al., 2000). Ce phénotype cellulaire observé chez les souris Skp2^{-/-} souligne l'importance physiologique de la ligase SCF^{Skp2} dans la régulation du cycle cellulaire, et l'intégrité du génome. Vu le phénotype cellulaire des souris Skp2^{-/-} et l'importance de Skp2 à la transition G1/S et durant la mitose suite à la dégradation de nombreux CKIs, il est facile à imaginer qu'une dérégulation telle que la surexpression de Skp2 ou l'amplification du gène codant pour Skp2 soit à l'origine d'une dérégulation du cycle cellulaire, et du développement de tumeurs. Ceci est en effet le cas, car la surexpression de Skp2 est observée dans une grande variété de cancers épithéliaux, où des hauts niveaux de Skp2 corrélerent avec de faibles niveaux de p27 (Bloom and Pagano, 2003). Les mécanismes à l'origine de la surexpression de Skp2 dans différents cancers sont encore inconnus ; cependant, ils pourraient être en rapport avec une dérégulation de l'APC/C^{Cdh1} (Lin and Diehl, 2004).

Bien que la ligase SCF^{Skp2} cible plusieurs régulateurs clés du cycle cellulaire, p27^{Kip1} est son substrat majeur. Cette idée est supportée par le fait qu'une souris double KO Skp2^{-/-} p27^{-/-} ne présente quasiment plus aucun phénotype cellulaire observé chez la souris Skp2^{-/-}, tel que la polyploïdie (Nakayama et al., 2004).

Suite à la découverte que Skp2 est la protéine « F-Box » du complexe E3 ligase SCF dégradant p27 d'une manière phospho-dépendante (Carrano et al., 1999), Ganoth et al ont essayé de mettre au point un essai d'ubiquitination *in vitro* de p27 en reconstituant tout le système SCF^{Skp2}. Cependant, le résultat fut surprenant. En effet, bien que le système *in vitro* contienne tous les éléments connus du complexe SCF^{Skp2}, autrement dit, l'enzyme E1, l'enzyme E2 (Ubc3), Roc1/Rbx1, Cullin 1, Skp1, Skp2, ainsi que le substrat p27 dans les bonnes conditions, c'est-à-dire phosphorylé sur la thréonine 187 par le complexe CDK2/cycline E/A et sous une forme hétérotrimérique avec ce même complexe, l'essai d'ubiquitination s'est révélé être un échec (Ganoth et al., 2001). La seule façon d'expliquer cet échec était de considérer qu'il devait exister une protéine adaptatrice inconnue essentielle au bon fonctionnement de SCF^{Skp2}. Afin de la découvrir, Ganoth et al ont choisi une méthode biochimique de fractionnement d'un extrait cellulaire de Hela, cette dernière visant à constituer deux fractions d'extrait cellulaire, une constituée des protéines n'ayant

pas attachées à la résine DEAE-cellulose, et l'autre formée des protéines qui se sont liées à la colonne et ont été éluées avec des concentrations croissantes de sels. La capacité de ces deux fractions d'extrait cellulaire à promouvoir la liaison de molécules d'ubiquitine méthylée sur p27 marqué au ^{35}S en présence de tous les autres éléments purifiés du système (E1, E2, Rbx1, Cull1, Skp1, Skp2, CDK2/cycline E) a été établie. La fraction constituée des protéines non-liées à la colonne s'est révélée être celle qui supportait l'ubiquitination de p27, et ainsi contenait l'élément manquant du système SCF^{Skp2}. Nedd8, une protéine du type ubiquitine, a été le premier candidat à être étudié, car il était décrit comme une protéine se liant à Culline1, et stimulant l'activité de SCF^{béta-Trcp} dans l'ubiquitination de I_{kappa}B_{alpha} (Wu et al., 2000). Cependant, Nedd8 s'est montré incapable de soutenir l'activité de SCF^{Skp2} dans l'ubiquitination de p27. Finalement, par des purifications successives, Ganoth et al ont découvert que l'élément manquant du complexe SCF^{Skp2} était une petite protéine appelée Cks1 (CDK subunit 1). En effet, l'ajout d'une protéine recombinante Cks1 dans le système *in vitro* permet à la ligase SCF^{Skp2} d'être fonctionnel dans l'ubiquitination de p27. Ceci constitue la première évidence qu'un complexe ubiquitine ligase SCF nécessite une protéine adaptatrice pour son activité d'ubiquitination et la liaison à son substrat spécifique phosphorylé. Dans le même temps, un autre groupe dirigé par Reed est arrivé à la même conclusion à propos du rôle essentiel de Cks1 dans la dégradation de p27 par la ligase SCF^{Skp2}. Cependant, à la différence du groupe d'Hershko, Spruck et al ont plutôt utilisé une méthode d'analyse génétique en étudiant le phénotype des souris Cks1^{-/-}, ces dernières ayant des cellules caractérisées par une accumulation massive du CKI p27^{Kip1}, n'étant plus dégradé (Spruck et al., 2001). Même si nous nous intéressons essentiellement dans ce mémoire à la dégradation de p27^{Kip1} par l'ubiquitine ligase SCF^{Skp2}, il est important de préciser que d'autres substrats de cette ligase, notamment p21^{Cip1}, p57^{Kip2} et p130, nécessitent l'adaptateur Cks1 pour être ubiquitinés efficacement dans des systèmes reconstitués *in vitro* (Bornstein et al., 2003; Kamura et al., 2003; Tedesco et al., 2002). Suite à la découverte de l'implication de Cks1 dans la dégradation de p27 via SCF^{Skp2}, la prochaine étape était de comprendre le rôle de cette protéine dans la dégradation de p27, et plus précisément son mode d'action au sein du complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2}. Sachant que Cks1 est capable d'interagir avec CDK2 (Bourne et al., 1996) ainsi que Skp2 (Spruck et al., 2001), et qu'il possède de plus un site de liaison pour les groupements phosphate

(Arvai et al., 1995), il était fort probable que Cks1 joue un rôle d'adaptateur non-catalytique, ou plus précisément d'interface protéique au sein du complexe SCF^{Skp2}. Cette idée était renforcée par le fait que Cks1 ne joue aucun rôle dans la phosphorylation de p27 sur la thréonine 187 par le complexe CDK2/cycline E. En effet, sans Cks1, p27 est phosphorylé très efficacement par ce complexe (Ganoth et al., 2001). Ainsi, deux modèles ont été proposés pour le rôle de Cks1 dans l'ubiquitination de p27. Le premier modèle, ou modèle allostérique, est basé sur le fait que Cks1, en se liant à Skp2, peut causer un changement allostérique au niveau du C-terminal de cette protéine « F-Box », ce qui lui permet de reconnaître p27 phosphorylé sur la thréonine 187, ce qui n'était pas possible avant l'interaction avec Cks1 (Fig.14b) (Spruck et al., 2001; Xu et al., 2003). Ce modèle allostérique est supporté par la structure cristallographique de Skp2, cette dernière montrant que le domaine C-terminal de liaison au substrat composé des répétitions LRR est bloqué par une queue C-terminale non-structurée (Schulman et al., 2000). Cks1, en se liant à Skp2, pourrait donc déplacer cette queue C-terminale inhibitrice, ce qui permettrait à la protéine « F-Box » de lier son substrat via ses répétitions LRR. Dans le second modèle appelé adaptateur, l'hypothèse est que Cks1, par l'intermédiaire de son interaction simultanée avec le complexe hétérotrimérique CDK2-cyclineE-p27 PThr187 et la protéine « F-Box » Skp2, peut favoriser le recrutement du substrat par Skp2 (Fig.14c) (Ganoth et al., 2001; Sitry et al., 2002). Ces deux modèles ne sont cependant pas exclusifs. En effet, il est fort probable que Cks1, en plus de créer un changement allostérique sur Skp2, favorise le recrutement de p27 PThr187 par Skp2 via non seulement son interaction avec le complexe hétérotrimérique CDK2-cyclineE-p27 PThr187, mais également son potentiel d'interaction avec le groupement phosphate présent sur p27 à la position 187.



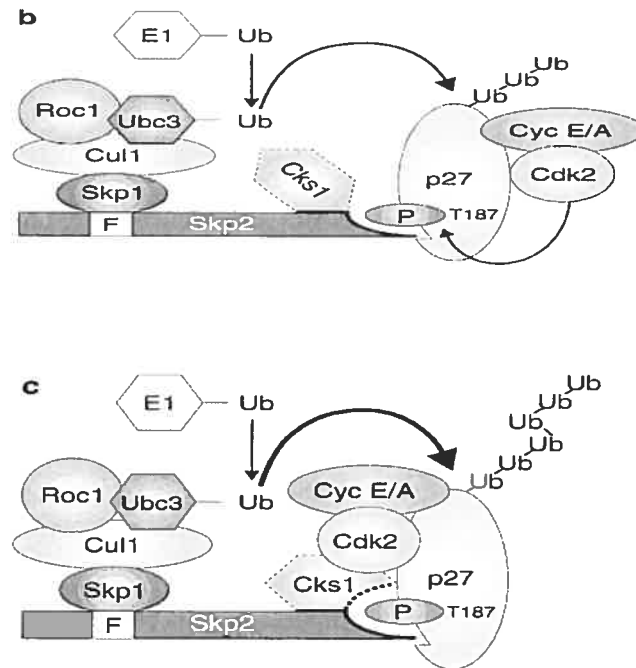


Figure 14 : Cks1 est essentiel pour l'ubiquitination de p27. a. SCF^{Skp2} est non-fonctionnel sans Cks1. b. Bases du modèle allostérique. c. Bases du modèle adaptateur (Bartek and Lukas, 2001).

Très récemment, la structure cristallographique d'une partie du complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2} , et plus précisément, le sous-complexe Skp1-Skp2-Cks1-phosphopeptide 175 à 198 de p27, a révélé que Cks1 n'est pas seulement un adaptateur mais en fait constitue une partie majeure de la surface de liaison du complexe SCF^{Skp2} pour p27 phosphorylé sur la thréonine 187 (Fig.15) (Hao et al., 2005). En effet, sur un total d'environ 1140 Å² de surface d'interaction entre l'interface Skp2-Cks1 et le phosphopeptide de p27, environ 740 Å² sont comblés par l'interaction Cks1-p27, et uniquement 400 Å² par l'interaction Skp2-p27 (Hao et al., 2005). Ceci est inattendu, car la protéine « F-Box » Skp2 possède un domaine de liaison au substrat composé de 10 répétitions LRR, ce qui semblait assez complexe en théorie pour permettre l'interaction complète du complexe ubiquitine ligase avec son substrat p27 phosphorylé. Cependant, malgré sa petite taille et sa simplicité structurale comparée à la grosseur et à la complexité de Skp2, la contribution de Cks1 dans l'interaction de SCF^{Skp2} avec p27 est très importante. Le rôle de Cks1 dans cette interaction est d'autant plus important que le groupement phosphate présent sur la thréonine 187 de p27, ce dernier constituant le signal de dégradation majeur de p27, interagit exclusivement avec Cks1, via son site de liaison pour les anions (Arvai et al., 1995; Hao et al., 2005).

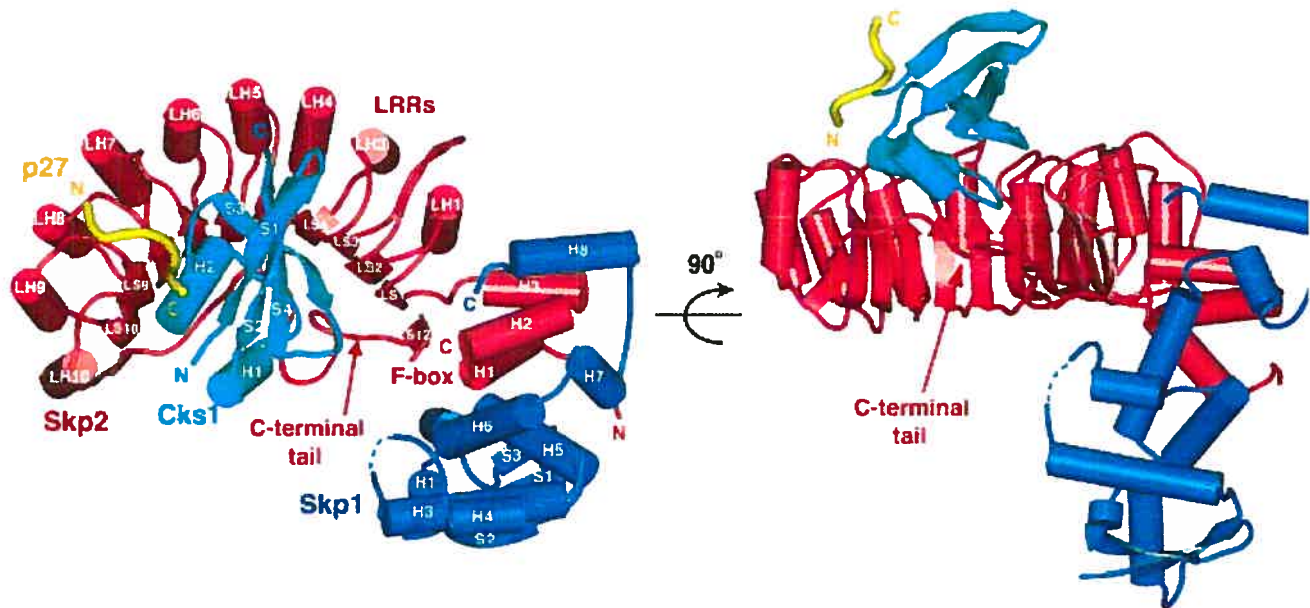


Figure 15 : Structure cristallographique du complexe Skp1-Skp2-Cks1-p27^{Kip1} (Hao et al., 2005).

Alors que la queue C-terminale de 39 acides-aminés de Skp2 était décrite comme un domaine bloquant l'accès au site de liaison du substrat de Skp2 (Schulman et al., 2000), la structure cristallographique du complexe Skp1-Skp2-Cks1-phosphopeptide p27 révèle qu'en fait cette extrémité C-terminale, en se reposant sur la surface concave formée par les 10 répétitions LRR, joue le rôle d'une plateforme pour la liaison de Cks1 à Skp2 (Hao et al., 2005). De plus, à la différence de ce qui avait été présumé dans le modèle allostérique, l'interaction entre Cks1 et Skp2 ne cause aucun changement allostérique dans ces deux protéines. Il semble plutôt que l'association rigide de ces deux protéines forme le site de liaison pour p27 phosphorylé (Hao et al., 2005). En ce qui concerne l'interaction entre Skp2 et Cks1, celle-ci s'étend sur cinq répétitions LRR (6 à 10) et sur une partie de la queue C-terminale non-structurée de Skp2. De plus, cette interaction est basée sur des réseaux de liaisons hydrogène ainsi que des contacts de Van der Waals. Le réseau le plus important de liaisons hydrogène se fait entre le domaine LRR de Skp2 et l'hélice H2 de Cks1, et met en jeu les acides aminés Trp265, Arg294, Asp319 et Arg344 pour Skp2, ainsi que les résidus Glu40, Ser41 et Asn45 pour Cks1 (Fig.16) (Hao et al., 2005). Ces différents acides aminés impliqués dans l'interaction Cks1-Skp2 sont très conservés parmi les orthologues de Cks1

et Skp2 (Hao et al., 2005). De plus, l'importance de ces acides aminés dans l'interface Skp2-Cks1 est soulignée par le fait que des mutations ponctuelles de ces différents résidus causent l'inhibition de l'interaction (Sitry et al., 2002; Wang et al., 2004). Le laboratoire de Liu a identifié d'autres acides aminés de Skp2 essentiels à l'interaction Skp2-Cks1, et par conséquent à l'ubiquitination de p27, ces derniers n'ayant pas été répertoriés par le groupe de Pavletich suite à leur structure cristallographique. Il s'agit des résidus Trp277, Asp331, Arg356 et Phe380 situés au niveau du domaine de liaison au substrat (répétitions LRR), ainsi que les résidus Phe405, Thr406, Ile408 et Arg410 situés au niveau de la queue C-terminale non-structurée (Wang et al., 2003; Wang et al., 2004).

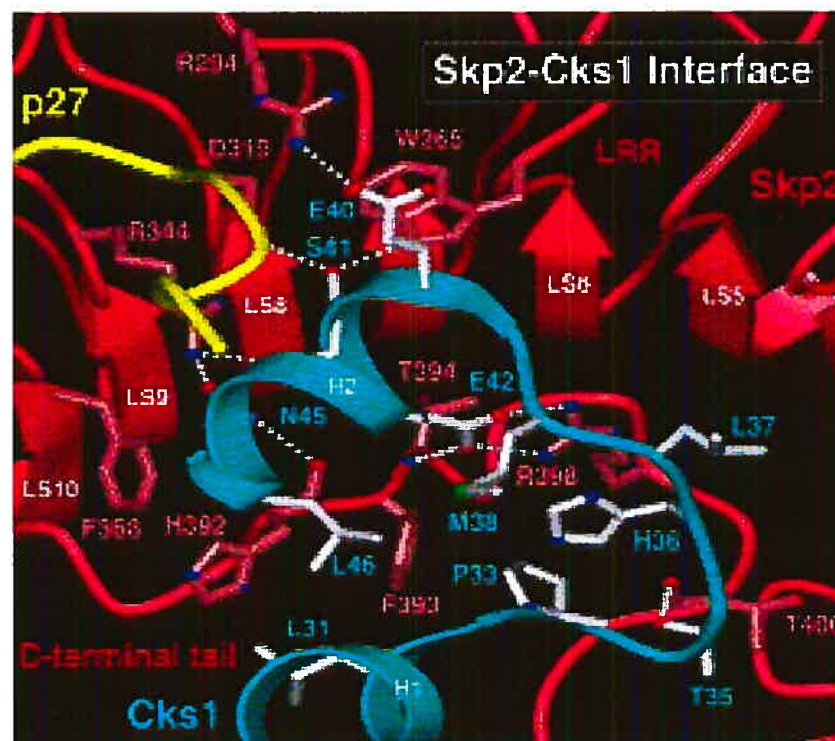


Figure 16 : Détails de l'interface d'interaction Skp2-Cks1, montrant les acides aminés essentiels dans Cks1 (bleu) et Skp2 (rose). La portion de Cks1 qui n'est pas impliquée dans cette interaction a été omise pour des raisons de clarté. Les liaisons hydrogène sont représentées par des points blancs (Hao et al., 2005).

En ce qui concerne l'interaction de p27 phosphorylé avec son interface de liaison Skp2-Cks1, les résidus 181 à 184 du phosphopeptide de p27 lient exclusivement Skp2, l'acide glutamique 185 lie les deux protéines, et finalement, les résidus 186 à 190 interagissent uniquement avec Cks1 (Hao et al., 2005). Cependant, la grande majorité des contacts intermoléculaires entre p27 et l'interface Skp2-Cks1 se fait via les chaînes latérales de

l'acide glutamique 185 et de la phospho-thréonine 187 (Hao et al., 2005). Le groupement phosphate présent sur la thréonine 187 de p27 interagit exclusivement avec Cks1 par l'intermédiaire de résidus situés au niveau des 4 brins du feuillet bêta de Cks1, autrement dit, au niveau du site de liaison pour les groupements phosphate proposé par Arvai et al en 1995. Plus précisément, la phospho-thréonine 187 de p27 forme des liaisons hydrogène non seulement avec les chaînes latérales des résidus Lys11, Arg20, Ser51 et Trp54 de Cks1, mais aussi avec l'atome d'azote situé sur la chaîne centrale de la sérine 51 (Fig.17) (Hao et al., 2005). Ces quatre résidus de Cks1 sont conservés entre les espèces, et des mutations ponctuelles de Lys11, Arg20 et Trp54 diminuent drastiquement le potentiel de Cks1 à supporter l'ubiquitination de p27, à la différence de la sérine 51 dont la mutation n'a aucun effet négatif sur la ligation de molécules d'ubiquitine à p27 (Sitry et al., 2002). Bien que le groupe de Pavletich considère que la phospho-thréonine 187 de p27 interagit uniquement avec des résidus présents sur Cks1, le groupe de Liu a montré l'existence sur Skp2 d'un acide aminé essentiel à l'interaction de cette protéine avec un phosphopeptide de p27 contenant pThr187. En effet, la forme mutante de Skp2 R306A n'est pas capable d'interagir avec le phosphopeptide, et de promouvoir l'ubiquitination de p27 phosphorylé (Ungermannova et al., 2005). Le second acide aminé essentiel à l'interaction de p27 avec SCF^{Skp2-Cks1}, l'acide glutamique 185, est très conservé parmi les orthologues de p27^{Kip1}. Ce résidu, localisé à l'interface de la liaison Skp2-Cks1, forme de nombreuses liaisons hydrogène avec des résidus sur Cks1, notamment Gln52 et Arg44, ainsi que sur Skp2, notamment Arg294 et Tyr346 (Fig.17) (Hao et al., 2005). Considérant ces acides aminés interagissant avec l'acide glutamique 185 de p27, la mutation R294A de Skp2 bloque l'ubiquitination de p27 par le complexe SCF^{Skp2-Cks1} (Ungermannova et al., 2005). Afin de confirmer l'importance de Glu185 et pThr 187 dans l'interaction de p27 avec SCF^{Skp2-Cks1}, il a été démontré que les formes mutantes de p27 E185A et T187A ne pouvaient pas être ubiquitinées (Hao et al., 2005). Ainsi, Cks1 se révèle être essentiel dans l'ubiquitination de p27, car la majorité des contacts entre p27 phosphorylé et SCF^{Skp2} se fait via Cks1.

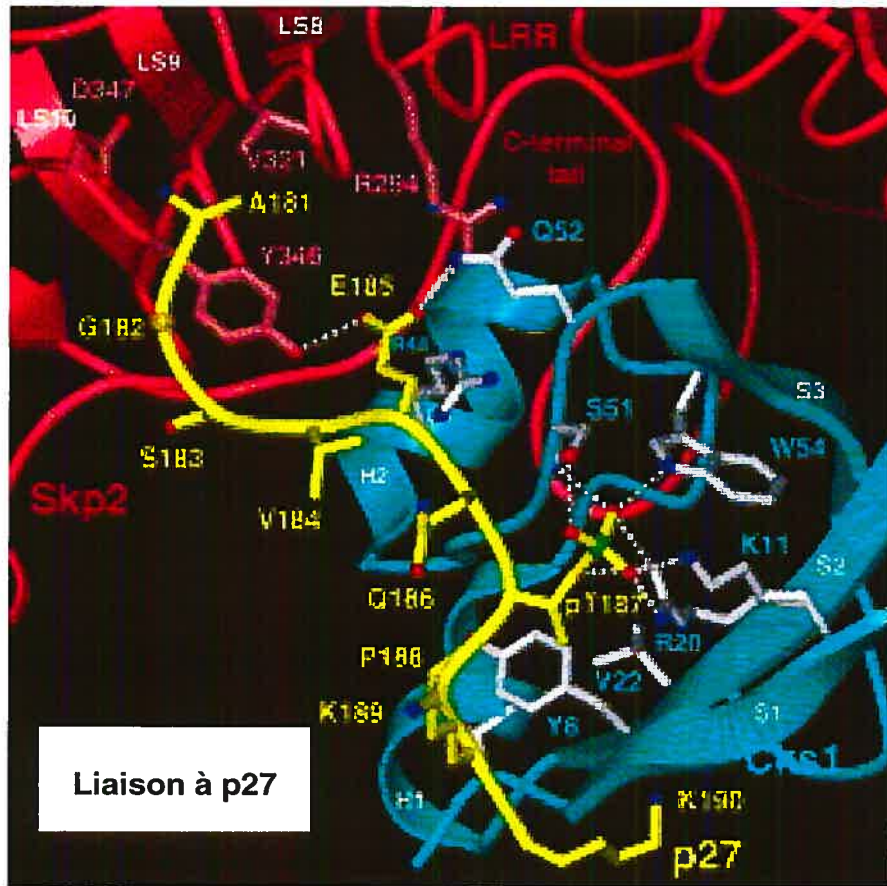


Figure 17 : Détails de l'interaction entre p27 phosphorylé sur la Thr187 et l'interface Skp2-Cks1, montrant les acides aminés essentiels dans Cks1 (bleu), Skp2 (rose), et p27 (jaune) (Hao et al., 2005).

D'après la structure cristallographique de Pavletich, on peut déduire que le phosphodégron de p27 reconnu spécifiquement par le complexe $SCF^{Skp2-Cks1}$ dépend juste de deux résidus, l'acide glutamique 185 et la phospho-thréonine 187. De plus, en observant les phosphodégrons d'autres substrats de $SCF^{Skp2-Cks1}$, notamment p57 et p21 (Bornstein et al., 2003; Kamura et al., 2003), on peut remarquer que chacun d'entre eux possède un glutamate en position -2 par rapport au résidu phosphorylé spécifique. Ainsi, la spécificité de $SCF^{Skp2-Cks1}$ pour ses substrats semble être basée sur un phosphodégron composé simplement d'un résidu phosphorylé et d'un glutamate en position -2 (Hao et al., 2005). Ceci étant très peu spécifique, d'autres mécanismes doivent être impliqués afin d'augmenter le niveau de spécificité de la reconnaissance des substrats par SCF^{Skp2} . En fait, la spécificité de substrat est assurée par le fait que les différentes cibles de SCF^{Skp2} sont recrutées au sein de ce complexe ubiquitine ligase sous une forme hétérotrimérique avec un

complexe CDK-Cycline, ce dernier étant CDK2-cycline E/A pour p27 (Ungermannova et al., 2005). Sachant cela et sachant que l'interface Skp2-Cks1 a le potentiel de lier simultanément p27 phosphorylé, CDK2, et cycline A (Bourne et al., 1996; Hao et al., 2005; Jeffrey et al., 1995; Yam et al., 1999), les différentes interactions potentielles entre le substrat sous forme trimérique et l'interface Skp2-Cks1 sont nombreuses, et donnent par conséquent une très grande spécificité à cette interaction, ainsi qu'une très grande affinité de la ligase SCF^{Skp2-Cks1} pour ses substrats, ce qui permet une ubiquitination optimale. En effet, dans des systèmes *in vitro*, un complexe SCF^{Skp2-Cks1}, composé de formes mutantes de Cks1 ou Skp2 incapables de lier les CDKs, voit son efficacité de liaison à p27 phosphorylé diminuer drastiquement, ainsi que son potentiel d'ubiquitination (Sitry et al., 2002; Spruck et al., 2001). De plus, le fait que le site de liaison de Cks1 pour CDK2 est distinct spatialement des autres domaines de liaison pour Skp2 et p27 est en accord avec le rôle du complexe CDK2-cycline E/A dans la stimulation de l'ubiquitination de p27 par un meilleur positionnement du substrat au sein de la ligase (Hao et al., 2005).

Finalement, en superposant les structures cristallographiques des complexes Skp1-Skp2(deltaN88)-Cks1-p27^{Kip1}, Cul1-Rbx1-Skp1-Skp2(deltaN88), Cks1-CDK2, et CDK2-cycline A-p27^{Kip1}(NTD) (Bourne et al., 1996; Russo et al., 1996; Zheng et al., 2002), le groupe de Pavletich a développé un modèle pour le complexe SCF^{Skp2-Cks1-p27^{Kip1}}-CDK2-cycline A (Fig.18). Ce modèle suggère la possibilité que ces 9 protéines puissent coexister dans un seul complexe macromoléculaire, et ceci sans trop d'encombrements stériques.

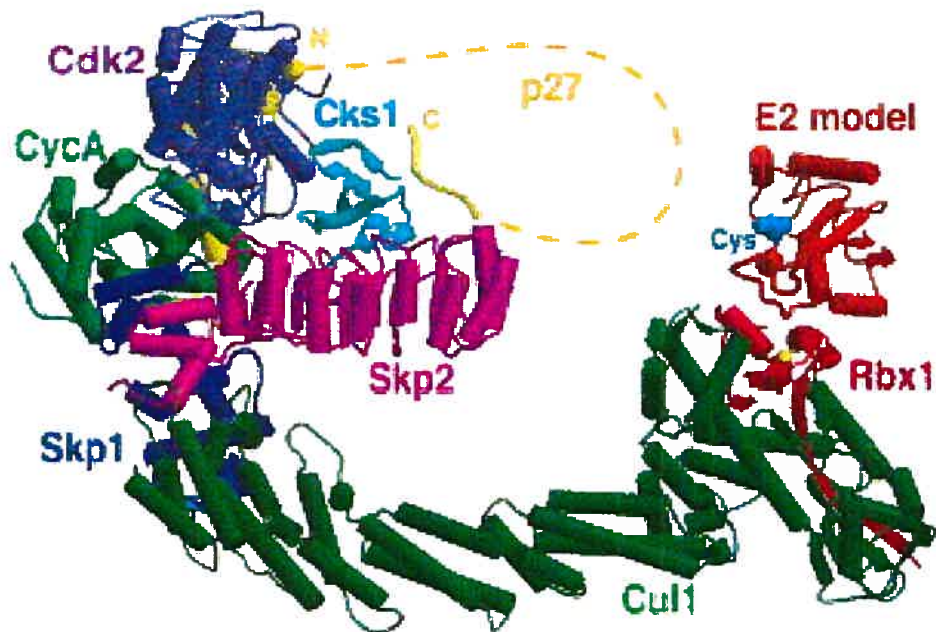


Figure 18 : Modèle du complexe macromoléculaire E2-SCF^{Skp2}-Cks1-p27^{Kip1}-Cdk2-cyclineA suggérant que ces 9 protéines peuvent potentiellement coexister dans un même complexe *in vivo* (Hao et al., 2005).

1.3.3.2 KPC

En développant une souris « knock in » exprimant la protéine p27^{T187A} au lieu de la protéine sauvage, Malek et al ont suggéré l'existence d'un deuxième mécanisme protéolytique dégradant p27, ce dernier étant activé en G1 par des signaux mitogéniques, à la différence de SCF^{Skp2-Cks1} fonctionnant à son maximal durant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Ceci a été découvert suite à l'observation que les cellules exprimant p27^{T187A}, bien que n'étant pas capables de déstabiliser leur forme mutante de p27 durant les phases G1/S, S et G2 du cycle cellulaire dû à un mauvais fonctionnement de la ligase SCF^{Skp2-Cks1}, pouvaient dégrader leur forme de p27 avec la même cinétique que p27 sauvage durant la phase G1, et ainsi ne montraient pas de phénotype majeur en terme de retard prolifératif (Malek et al., 2001). Ce nouveau mécanisme protéolytique possède trois particularités majeures. Tout d'abord, ce système de dégradation dépend du protéasome 26S puisqu'un traitement des MEFs p27 T187A avec du MG132, ce dernier étant un inhibiteur du protéasome, bloque la dégradation de p27^{T187A} active en G1 (Malek et al., 2001). De plus,

sa deuxième particularité correspond à sa dépendance pour les signaux mitogéniques, à la différence du complexe ubiquitine ligase $SCF^{Skp2-Cks1}$. Finalement, sa troisième caractéristique est son fonctionnement PThr187-indépendant (Malek et al., 2001). L'idée qu'il existe un deuxième mécanisme protéolytique ciblant p27 en G0/G1 a été renforcée par la découverte que la dégradation de p27 en G0/G1 avait lieu normalement dans des cellules $Skp2^{-/-}$ (Hara et al., 2001).

Le nouveau complexe ubiquitine ligase ciblant p27 en G1 a été identifié (Kamura et al., 2004). Il s'agit du complexe KPC (Kip1 ubiquitination promoting complex), ce dernier étant composé de deux sous-unités, KPC1 et KPC2. Dans ce système de dégradation, KPC1, possédant un domaine « Ring-Finger », est la sous-unité catalytique essentielle à l'activité ubiquitine ligase, tandis que KPC2, étant constitué d'un domaine UBL (Ubiquitin-like) et deux domaines UBA (Ubiquitin-associated), joue plutôt le rôle d'une sous-unité régulatrice (Kamura et al., 2004). En effet, en possédant un domaine UBL en N-terminal et deux domaines UBA en C-terminal, KPC2 partage des similarités structurales avec la protéine Rad23, cette dernière ayant le potentiel de lier des protéines polyubiquitinées spécifiques, telles que Sic1 chez la levure (Verma et al., 2004), et de les recruter au protéasome 26S en vue de leur dégradation (Hengst, 2004). Ainsi, KPC2 pourrait recruter p27 polyubiquitiné au protéasome. Suite à des alignements de séquences avec le génome humain, il s'est révélé que KPC1 s'aligne uniquement avec des ESTs (Expressed Sequences Tags), alors que KPC2 semble être l'orthologue de GBDR1 (Human glioblastoma cell-differentiation-related-1 gene) dont la fonction n'est pas encore connue chez l'humain (Kamura et al., 2004). En plus d'avoir identifié la ligase E3, Kamura et al ont montré qu'uniquement les enzymes E2 Ubc4 et UbcH5A ont le potentiel de collaborer avec le complexe KPC afin d'ubiquitiner p27. En ce qui concerne son spectre de substrats, bien que le complexe KPC possède une activité ubiquitine ligase sur $p27^{Kip1}$, il n'en est pas de même pour les autres CKIs $p21^{Cip1}$ et $p57^{Kip2}$, à la différence du complexe ubiquitine ligase $SCF^{Skp2-Cks1}$ (Kamura et al., 2004). Hormis sa dépendance pour les signaux mitogéniques et son activité PThr187-indépendante, le complexe KPC possède la particularité fonctionnelle d'être localisé dans le cytoplasme, alors que $SCF^{Skp2-Cks1}$ se situe dans le noyau. Ainsi, l'export nucléaire de $p27^{Kip1}$ en G0/G1 par l'intermédiaire d'un

mécanisme CRM-1 dépendant est crucial en vue de sa dégradation protéolytique via le complexe KPC (Kamura et al., 2004).

L'inhibition du complexe KPC par RNAi bloque la dégradation de p27 uniquement en G0/G1, mais ne cause pas d'effets négatifs majeurs sur la progression de MEFs sauvages de G1 à S. Cependant, dans des MEFs *Skp2*^{-/-}, l'inhibition de ce même complexe par RNAi résulte non seulement en un blocage de la dégradation de p27 tout au long du cycle cellulaire, mais également en un retard prononcé dans la progression à travers le cycle. Étant donné que les MEFs *Skp2*^{-/-} ne montrent pas de retard majeur dans la progression du cycle cellulaire, ceci met en évidence le rôle complémentaire potentiel de ces deux ligases dans la dégradation de p27 et le bon déroulement du cycle cellulaire (Kamura et al., 2004). En effet, le complexe KPC gère la dégradation de p27 en G1 dans le cytoplasme, alors que le complexe SCF^{Skp2-Cks1} assure la dégradation de ce CKI dans le noyau durant les phases S et G2 du cycle cellulaire. De plus, étant donné que les MEFs *Skp2*^{-/-} *p27*^{-/-} traitées avec un shRNA contre KPC1 ne montrent plus le retard dans la progression du cycle cellulaire observé dans les MEFs *Skp2*^{-/-} traitées avec ce même shRNA, ceci montre que p27 est en effet le substrat clé de non seulement SCF^{Skp2-Cks1}, mais aussi KPC (Kamura et al., 2004).

D'après des essais d'ubiquitination *in vitro* de p27 à l'aide de protéines recombinantes, la sous-unité catalytique KPC1 du complexe ubiquitine ligase KPC est suffisante pour supporter l'ubiquitination de p27. En effet, d'une façon surprenante, l'addition de KPC2 dans le système *in vitro* diminue drastiquement la polyubiquitination de ce CKI (Kamura et al., 2004). Le fait que KPC2 peut réduire l'activité ubiquitine ligase de KPC1 *in vitro* est en accord avec l'idée que KPC2 fonctionne d'une façon similaire à Rad23. En effet, Rad23 a le potentiel d'inhiber la formation de chaînes de polyubiquitine *in vitro* (Ortolan et al., 2000). Cependant, étant donné que l'activité ubiquitine ligase du complexe KPC a été trouvée uniquement dans des fractions contenant les deux sous-unités KPC1 et KPC2, il est possible que l'activité optimale de ce complexe nécessite une modification du complexe, ou alors une autre protéine non-identifiée qui n'est donc pas présente dans les essais d'ubiquitination *in vitro* de p27 (Hengst, 2004).

Bien que le complexe KPC soit actif dans le cytoplasme d'une façon constitutive au cours du cycle cellulaire, la dégradation de p27 par ce système est très transitoire, et se passe uniquement en phase G1. Ceci suggère que l'export nucléaire de p27 a lieu seulement en

G1 (Kamura et al., 2004). Cependant, la coexistence de ces deux protéines dans le cytoplasme n'est pas suffisante pour permettre la dégradation de p27 par le complexe KPC. En effet, une forme de p27 mutante au niveau du domaine NLS (Nuclear Localization Signal), cette dernière étant séquestrée dans le cytoplasme, n'est pas dégradée par la ligase KPC (Kamura et al., 2004). Cette observation inattendue souligne l'importance de cet export nucléaire, et la possibilité que la dégradation de p27 par KPC dans le cytoplasme nécessite au préalable des modifications nucléaires de p27. Étant donné que ces modifications de p27 peuvent être régulées très finement au fil du cycle cellulaire, la dégradation de p27 par KPC peut être restreinte à une période précise du cycle où ces modifications sont effectuées. Ainsi, au lieu que l'export nucléaire de p27 soit limité à la phase G1 du cycle cellulaire, il est possible que p27 fasse des va et viens entre le noyau et le cytoplasme durant tout le cycle, et que p27 soit uniquement modifié durant la phase G1, ceci expliquant sa dégradation (Hengst, 2004).

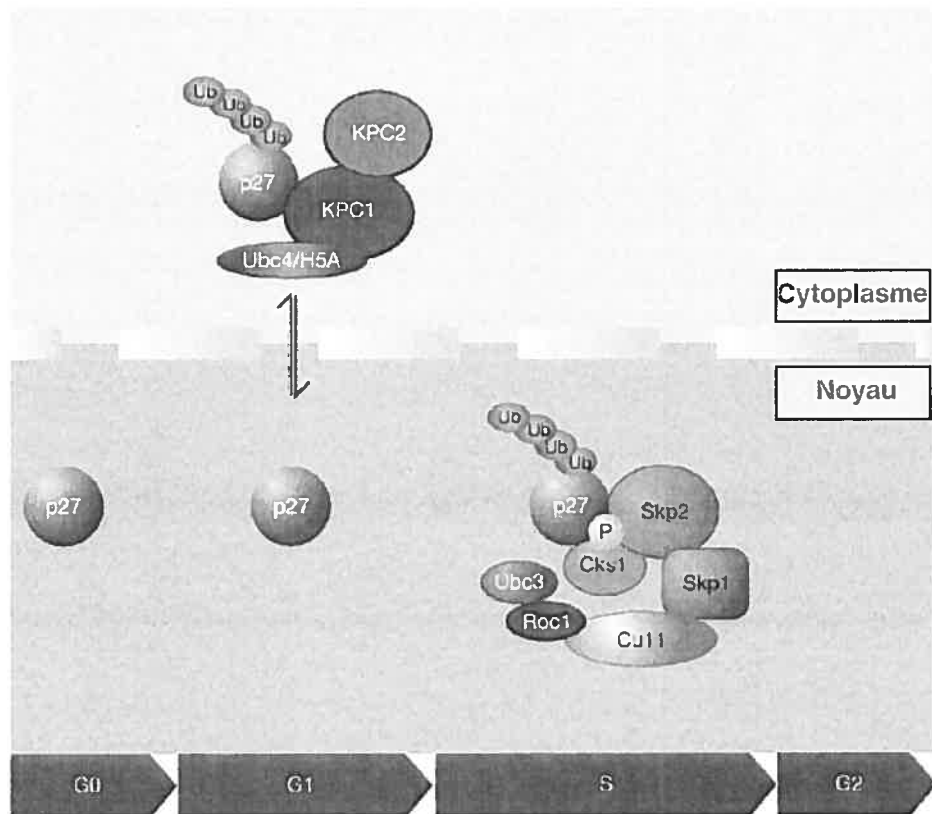


Figure 19 : La régulation de la stabilité de p27^{Kip1} au cours du cycle cellulaire est assurée en grande partie par l'activité séquentielle de deux complexes ubiquitine ligases : KPC en G1 et SCF^{Skp2-Cks1} en S ainsi que G2 (Hengst, 2004).

L'étude de Kamura et al, mettant en évidence l'existence d'une nouvelle E3 ligase dégradant spécifiquement p27^{Kip1}, souligne le fait que la régulation de p27 au cours du cycle cellulaire est loin d'être complètement comprise. Ce sentiment est renforcé par la suggestion très récente d'une autre voie de dégradation ubiquitine-protéasome-dépendante ciblant spécifiquement p27^{Kip1} (Bondar et al., 2006; Higa et al., 2006). En effet, en janvier 2006, les groupes de Zhang et Raychaudhuri ont suggéré que le complexe protéique Cullin4 (CUL4)-DDB1-COP9/signalosome pouvait être la base d'une nouvelle classe d'ubiquitine ligase E3 impliquée dans la dégradation de p27^{Kip1}, et par conséquent la régulation du cycle cellulaire. En effet, dans des cellules humaines, l'inactivation par RNAi de l'un des paralogues de la protéine CUL4, CUL4A, entraîne la stabilisation du CKI p27^{Kip1} et par conséquent l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (Higa et al., 2006). De plus, le fait que la double inactivation par RNAi de CUL4A et p27^{Kip1} rétablisse le bon « timing » du cycle cellulaire renforce l'idée que p27 peut être un substrat spécifique d'une E3 ligase basée sur CUL4 (Higa et al., 2006). Finalement, l'existence de cette E3 ligase basée sur CUL4A dégradant spécifiquement p27^{Kip1} reste qu'une hypothèse car des essais d'ubiquitination *in vitro* de p27 par cette ligase n'ont pas pu être développés du fait de problèmes techniques (Higa et al., 2006).

1.4 L'adaptateur du cycle cellulaire Cks1

1.4.1 Identification et généralités fonctionnelles

Les protéines de la famille Suc1/Cks ont été identifiées initialement via leur fonction de suppresseurs génétiques de mutations dans le gène CDK1 (autres appellations : Cdc2 et Cdc28) chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* (Hadwiger et al., 1989; Hayles et al., 1986). En effet, p13^{Suc1} présent dans la levure *S. pombe* est devenu en 1986 le fondateur de la famille Suc1/Cks très conservée parmi les eucaryotes (Hayles et al., 1986). Depuis, de nombreux homologues de Suc1 ont été identifiés dans différents organismes ; entre autres, Cks1 chez la levure *S. cerevisiae* (Hadwiger et al., 1989), Cks1 et Cks2 chez les mammifères (Richardson et al., 1990), Xe p9 chez *X. laevis* (Patra and Dunphy, 1996), Cks30A et Cks85A chez *D. melanogaster* (Schupbach and Wieschaus, 1989), Cks1 et Cks2 chez *C. elegans* (Polinko and Strome, 2000), et finalement AmphiCks1 chez l'Amphioxus (Yang et al., 2005). Ainsi, en 1990, Richardson et al ont cloné deux homologues humains du gène Cks1 de levure, ces derniers étant désignés hCks1 et hCks2, et codant pour deux protéines distinctes de 79 acides aminés et de poids moléculaire 9 KDa. En parallèle, Richardson et al ont montré également que ces deux homologues humains sont capables de substituer fonctionnellement Cks1 dans la levure *S. cerevisiae*, suite à une mutation « perte de fonction » de ce gène de levure. Un peu plus tard, par une méthode d'hybridation *in situ*, hCks1 a été localisé dans la région 8q21, un locus rarement altéré dans les cancers. Cependant, hCks2 a été localisé dans la région 9q22, cette dernière étant très proche du locus d'un suppresseur de tumeur responsable de la susceptibilité à un désordre familial de cancer appelé le syndrome de Gorlin (Demetrick et al., 1996).

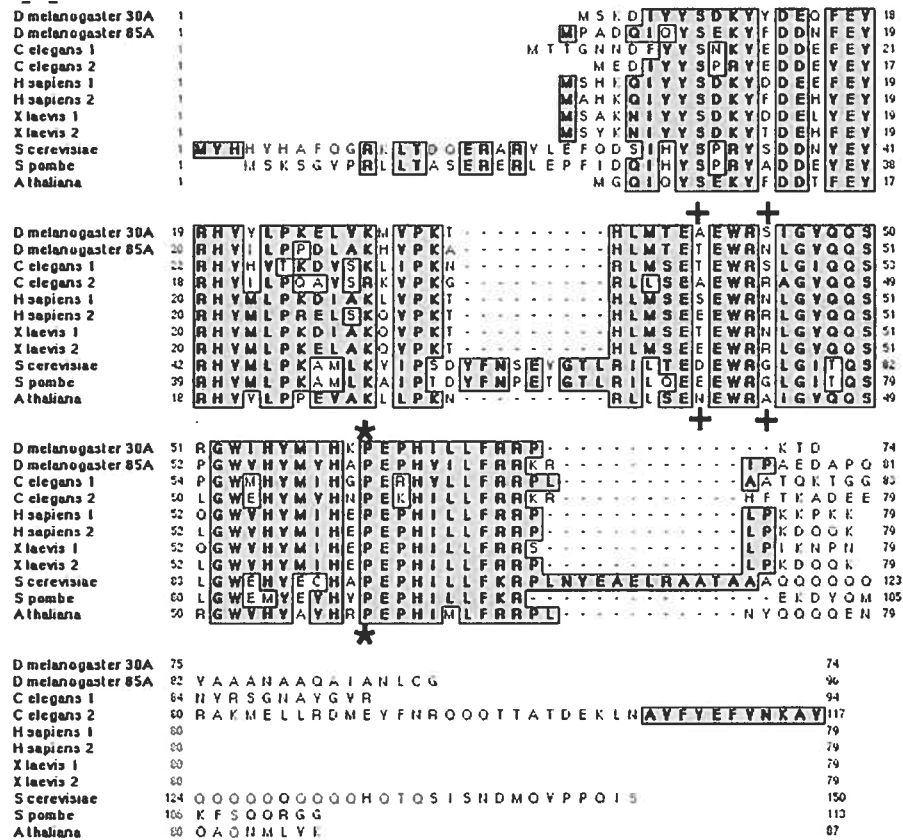


Figure 20 : Alignement des séquences primaires des protéines Cks de divers organismes eucaryotes. Les régions encadrées en gris sont les plus conservées (Swan et al., 2005).

Les protéines de la famille Suc1/Cks sont décrites comme des protéines régulatrices du cycle cellulaire ayant le potentiel de lier avec haute affinité certaines CDKs, notamment CDK1 et CDK2, d'où leur appellation Cks signifiant « Cdc kinase subunit », « Cdc28 kinase subunit » ou « CDK kinase subunit ». L'interaction des protéines Cks avec les CDKs est favorisée lorsque les CDKs en question sont sous forme dimérique avec leur cyclines régulatrices respectives (Egan and Solomon, 1998).

Lorsqu'elles sont liées aux CDKs, notamment CDK1, les protéines Cks ne jouent pas le rôle d'activateurs ou d'inhibiteurs au sens propre, mais plutôt modulent la reconnaissance de substrats spécifiques par ces CDKs (Harper, 2001). En effet, chez la levure *S. cerevisiae*, certaines mutations du gène Cks1 causent un arrêt du cycle cellulaire en G1, et ceci semble être dû à une dérégulation de l'activité des complexes cyclines G1/CDK1 envers des substrats importants dans la progression de la transition G1/S, tels que les inhibiteurs des CDKs Sic1 et Far1 (Reynard et al., 2000; Tang and Reed, 1993). De plus, la suppression de

l'activité de Cks1 dans des extraits de levure *S. cerevisiae* cause également des anomalies et plus précisément des retards dans l'entrée et la sortie de mitose. Ce phénotype est probablement dû au fait que Cks1 favorise la multi-phosphorylation de divers substrats mitotiques de CDK1, tels que la phosphatase Cdc25, les kinases Wee1 et Myt1, ou encore certains éléments de l'APC comme *cdc27* (Tang and Reed, 1993). Ce rôle des protéines Cks dans la régulation de la mitose est confirmé par le fait que des mutants « perte de fonction » de *Suc1* chez *S. pombe* voient leur cycle cellulaire stoppé à l'anaphase (Moreno et al., 1989). En plus de son rôle pro-mitotique dans la multiphosphorylation activatrice de différents substrats mitotiques de CDK1, Cks1 chez *S. cerevisiae* est également impliqué dans la promotion de la phase M en modulant la transcription du gène *Cdc20*, ce dernier étant l'activateur du complexe ubiquitine ligase APC/C impliqué dans la dégradation de la sécurine, ceci permettant la ségrégation des chromatides sœurs de chaque chromosome entre les deux cellules filles durant l'anaphase (Morris et al., 2003). Plus précisément, le rôle du complexe Cks1-CDK1 est de recruter le protéasome 26S au promoteur de *Cdc20* afin de favoriser la transcription de ce gène en modifiant des complexes transcriptionnels ou en remodelant la chromatine associée avec ce gène (Morris et al., 2003). Cependant, en 2005, le groupe de Reed a montré que l'activité transcriptionnelle kinase-indépendant du complexe Cks1-CDK1 n'est pas spécifique au gène *Cdc20*. En effet, dans un « screen » transcriptionnel comparant des cellules sauvages et *Cks1*^{-/-} chez la levure *S. cerevisiae*, ils ont observé qu'environ 25% des gènes de levure sont dépendants de Cks1 pour une transcription efficace (Yu et al., 2005). Les gènes les plus affectés par l'inactivation de Cks1 dans le « screen » transcriptionnel sont ceux qui subissent une induction rapide suite à des signaux de stress. Ainsi, l'activité transcriptionnelle du complexe Cks1-CDK1 peut être essentiellement exigée dans des conditions où la chromatine a besoin d'être rapidement remodelée pour supporter des changements rapides dans les niveaux de transcription (Yu et al., 2005).

Parmi les eucaryotes, les protéines Cks sont conservées non seulement au niveau structural mais aussi fonctionnel. Ainsi, les différentes protéines de cette famille présentes dans les différents organismes eucaryotiques jouent toutes des rôles dans la division cellulaire, quelle soit méiotique ou mitotique. En effet, dans *C. elegans*, Cks1, l'une des deux protéines Cks présentes dans cet organisme, joue un rôle dans la sortie de mitose, mais

aussi dans l'accomplissement des divisions méiotiques maternelles (Polinko and Strome, 2000). D'un autre côté, Patra et Dunphy en 1996 ont reporté que Xe-p9 chez *X. laevis* supporte de multiples rôles essentiels dans le contrôle du cycle cellulaire, notamment la transition métaphase-anaphase durant la méiose II (Patra and Dunphy, 1996). Finalement, l'un des deux homologues de Cks dans la drosophile, Cks30A, est essentiel à la transition métaphase-anaphase chez la femelle durant la deuxième division méiotique, ainsi que pour les premiers cycles mitotiques de l'embryon. De plus, Cks30A est important dans l'un des aspects de l'entrée en mitose, autrement dit la formation du fuseau mitotique à la prométaphase (Swan et al., 2005).

Chez les mammifères, notamment la souris, Cks2, l'un des deux homologues des protéines Cks, est impliqué dans la transition métaphase-anaphase lors de la première division méiotique (Spruck et al., 2003). Cependant, il a été montré que Cks1 murin peut remplacer fonctionnellement Cks2 *in vivo* (Spruck et al., 2003). Ainsi, sachant que tous les organismes multicellulaires séquencés à date possèdent tous 2 gènes Cks, il n'est pas encore clair le degré de redondance fonctionnel entre les différentes protéines Cks d'un même organisme (Swan et al., 2005). De plus, l'un des rôles de Cks1 chez les mammifères a été déduit suite à l'étude du phénomène de polyploïdie dans des cellules musculaires lisses d'aorte (VSMC) chez des rats spontanément hypertendus. En effet, ces cellules montrent une surexpression de Cks1, et par conséquent ne parviennent pas à retarder la dégradation de la cycline B, ce qui entraîne une sortie de mitose précoce (Hixon et al., 2000). Ceci est dû au fait que Cks1 est impliqué dans l'activation du médiateur de la dégradation de la cycline B, Cdc20. Afin de confirmer le rôle essentiel de Cks1 dans le contrôle de la progression à travers la phase M dans des cellules de mammifères, il a été montré que l'infection de cellules VSMC de rat avec un rétrovirus causant la surexpression de hCks1 entraîne l'altération de leur point de restriction métaphase-anaphase, la dégradation non-contrôlée de la cycline B, la réentrée précoce dans le cycle cellulaire, et par conséquent le développement d'une polyploïdie (Hixon et al., 2000). Finalement, d'une façon surprenante, deux groupes ont montré en parallèle que hCks1 est également impliqué dans la régulation de la transition G1/S du cycle cellulaire en étant un élément essentiel du complexe protéolytique ubiquitine-protéasome SCF^{Skp2}, ce dernier dégradant spécifiquement l'inhibiteur de CDKs p27^{Kip1} en vue de la progression en phase S (Ganoth et

al., 2001; Spruck et al., 2001) (voir section 1.3.3.1 du mémoire). Ce rôle de hCks1 est surprenant du fait qu'il soit CDK-indépendant et qu'il ait lieu à la transition G1/S, alors que les protéines Cks jouent en général des fonctions CDK-dépendantes durant la mitose. Autre observation surprenante, ce rôle d'adaptateur dans le complexe SCF^{Skp2} lors de l'ubiquitination de p27 est spécifique à hCks1. En effet, bien que hCks2 soit homologue à 81% à hCks1, celui-ci ne peut pas servir de substitut dans ce rôle d'adaptateur (Spruck et al., 2001). Très récemment, une étude a suggéré que le rôle de hCks1 dans la dégradation de p27 peut être conservé dans d'autres organismes eucaryotes. En effet, chez *D. melanogaster*, Cks85A interagit avec un homologue de hSkp2 (Giot et al., 2003). Ainsi, Cks85A peut être l'orthologue de hCks1 chez la drosophile. Pourtant, dans *X. laevis*, l'inhibiteur de CDKs p27^{Xic1} est ubiquitiné et dégradé via le complexe ubiquitine ligase SCF^{xSkp2}, et ceci d'une manière indépendante de xCks1 appelé également Xe-p9 (Lin et al., 2006).

1.4.2 Structure

Les protéines de la famille Suc1/Cks sont des molécules adaptatrices ayant comme fonction canonique de coordonner l'assemblage de complexes multiprotéiques à différentes phases du cycle cellulaire. La structure cristallographique de hCks1 révèle que cette protéine est composée d'un feuillet bêta à 4 brins antiparallèles bêta 1 à bêta 4, ainsi que de deux hélices alpha, alpha 1 et alpha 2 (Arvai et al., 1995). Le feuillet bêta des protéines Cks est unique par le fait que chacune de ses faces est disponible pour des interactions intermoléculaires. En effet, aucune des faces de ce motif n'est en contact avec d'autres éléments structuraux de la protéine (Seeliger et al., 2005). En dépit de la grande homologie de séquence, la structure en 3D de hCks1 est totalement différente de celle de son homologue hCks2 ; cependant, d'une façon inattendue, il existe une grande ressemblance avec le repliement du domaine N-terminal de la kinase CDK2 (Arvai et al., 1995). De plus, d'après une étude du groupe d'Itzhaki, hCks1, à la différence de son homologue Suc1 chez *S. pombe*, est une protéine très instable, très sensible aux mutations en terme d'intégrité structurale. Ceci est dû au fait que l'étape thermodynamique limitante dans le repliement de hCks1 a lieu très tôt dans le processus de maturation de la protéine (Seeliger et al., 2003b). Finalement, par des études d'affinité de liaison, il est suggéré que hCks1 se trouve

essentiellement sous forme monomérique *in vivo* (Arvai et al., 1995). D'après les structures de hCks1 et hCks2, la région comprise entre les acides aminés Glu61 et His65 constitue un nouveau type de charnière bêta entre les brins bêta 3 et bêta 4, cette dernière se repliant sur elle-même pour former une structure bêta du type « épingle à cheveux » stable. Cette charnière bêta peut cependant prendre 2 conformations : une repliée stable présente essentiellement dans hCks1 sous forme monomérique, et une autre étendue instable présente essentiellement dans hCks2 sous forme dimérique ou hexasomérique (Arvai et al., 1995). Deux résidus proline conservés dans la charnière bêta sont les principaux déterminants de la conformation adoptée par les protéines Cks (Seeliger et al., 2005). De plus, le changement conformationnel au niveau du brin bêta 4 suite au mouvement de cette charnière se passe dans un laps de temps de l'ordre de la microseconde à la milliseconde (Seeliger et al., 2005). Ces variations dramatiques de conformation dans la structure de hCks1 peuvent être essentielles pour les différentes fonctions de cette protéine, et pourraient expliquer la grande variété d'activités dans laquelle hCks1 est impliqué (Arvai et al., 1995). Ainsi, l'activité de hCks1 est modulée par des variations structurales ayant lieu à des moments précis du cycle cellulaire, suite à divers signaux (Arvai et al., 1995). Plus précisément, les changements conformationnels de la charnière bêta sont contrôlés par des modifications dans l'environnement chimique de la cellule, en fonction des phases du cycle cellulaire (Bourne et al., 1996).

Toutes les protéines de la famille Suc1/Cks possèdent un feuillet bêta à 4 brins impliqué dans la liaison aux CDKs (Bourne et al., 1996). De plus, toutes ces protéines présentent également un site de liaison pour les anions, ce dernier pouvant lier entre autres des phosphates, sulfates, ou des résidus acides dans les protéines (Bourne et al., 1996). Ainsi, hCks1 lie CDK2 via ses quatre brins formant le feuillet bêta, et ceci au niveau du C-terminal de la kinase, une région de CDK2 éloignée du domaine N-terminal liant l'ATP, du domaine d'interaction avec les cyclines ou encore des sites de phosphorylation régulateurs (Bourne et al., 1996). CDK2 interagit avec hCks1 lorsque sa charnière bêta est dans une conformation fermée, pliée sur elle-même. Cependant, lorsque hCks1 est dans sa conformation étendue, CDK2 ne peut pas interagir. Ainsi, l'hétérogénéité conformationnelle de cette charnière bêta sur hCks1 est un mécanisme structural régulant potentiellement l'interaction entre ces deux protéines (Bourne et al., 1996). Cette idée est

renforcée par le fait que le passage de la conformation fermée à ouverte modifie drastiquement la région d'interface de hCks1 pour les CDKs en terme notamment de l'accessibilité des résidus clés à cette interaction (Bourne et al., 1996). Lors de la formation du complexe Cks1-CDK2, les changements structuraux sont localisés uniquement à l'interface de ces 2 protéines. Par conséquent, les protéines Cks ne semblent pas être impliquées dans la régulation des CDKs en induisant un changement conformationnel dans ces kinases (Bourne et al., 1996). D'un autre côté, la liaison du ligand commun à toutes les protéines Cks, CDK2, inhibe l'hétérogénéité conformationnelle de hCks1, en particulier au niveau du brin bêta 4, ainsi qu'une partie du site de liaison pour les phosphates au niveau du brin bêta 1 (Seeliger et al., 2005).

D'après la structure de hCks1, un groupement phosphate lie cette protéine adaptatrice dans une poche chargée positivement, et interagit avec 5 résidus conservés (Lys11, Arg20, Ser51, Trp54 et Arg71), ce qui suggère un site de liaison de hCks1 spécifique pour les groupements phosphate (Arvai et al., 1995). Ce site de liaison aux anions de hCks1, interagissant spécifiquement avec le phospho-épitope Ser/pSer/pThr/X, est situé sur la surface du feuillet bêta opposée au site de liaison pour les CDKs (Seeliger et al., 2003a). Cependant, étant donné qu'une face du complexe hCks1-CDK2 expose à la fois le site de liaison pour les phosphates de Cks1 et le site de liaison pour l'ATP de CDK2, hCks1, plutôt que d'activer ou d'inhiber les CDKs, peut recruter CDK2 à d'autres phosphoprotéines durant le cycle cellulaire pour compléter leur phosphorylation (Bourne et al., 1996). En dépit de la faible homologie de séquence entre ces deux protéines, la similarité structurale entre hCks1 et la région N-terminale de CDK2 en ce qui concerne le site de liaison pour les phosphates (ATP pour CDK2 et groupement phosphate pour hCks1) supporte l'importance biologique potentielle de ce site (Arvai et al., 1995).

Les résidus de hCks1 qui forment le site de liaison pour les ligands phosphorylés sont considérablement plus flexibles dans la forme libre de hCks1, comparée à la forme liée à CDK2. Ainsi, il existe potentiellement une coopération d'interaction entre hCks1 et CDK2 qui diminue l'entropie de configuration de Cks1, et par conséquent facilite la liaison de phosphoprotéines à hCks1, lorsqu'il est sous forme dimérique avec la kinase CDK2 (Seeliger et al., 2005). Cette communication entre les différentes surfaces fonctionnelles distantes spatialement de hCks1 peut être important pour la transduction de signaux,

l'allostérie, et la spécificité fonctionnelle de la protéine (Suel et al., 2003). Ceci est mis en évidence par le fait que des mutations dans le site de liaison pour CDK2 de hCks1 modifient l'affinité du site de liaison de Cks1 pour un phosphopeptide de p27, bien que ces 2 surfaces d'interaction soient très distantes à l'échelle de la protéine (Seeliger et al., 2003a). Ce couplage des différentes surfaces de liaison cause une pression évolutive sur les molécules adaptatrices telles que hCks1, car ceci augmente la probabilité qu'une simple mutation puisse altérer la fonction du complexe entier, et ainsi rendre tous les partenaires d'interaction de complexe inactifs (Seeliger et al., 2003a). Ainsi, les propriétés dynamiques du feuillet bêta et leurs modifications suite à la liaison de ligands spécifiques tels que CDK2 sont à l'origine de la fonction adaptatrice des protéines Cks.

hCks1, comparé aux autres protéines de la famille Suc1/Cks, possède une caractéristique unique, celle de présenter un site de liaison pour la protéine « F-Box » Skp2 dans sa région la moins conservée incluant les hélices alpha 1 et alpha 2, cette dernière étant bien séparée spatialement des 2 autres sites de liaison de hCks1 pour les CDKs et les groupements phosphate (Sitry et al., 2002). Le complexe SCF^{Skp2}, et en particulier l'étude de sa structure, met en évidence le rôle central de petites protéines adaptatrices telles que hCks1 dans ces complexes macromoléculaires, et souligne l'importance de la conservation de leur séquence et structure au cours de l'évolution. En effet, les 3 sites de liaison présents sur hCks1 sont nécessaires à l'ubiquitination de p27 par SCF^{Skp2}, et à la liaison de haute affinité de p27 phosphorylé sur la Thr 187 à Skp2 (voir section 1.3.3.1 du mémoire). D'après la localisation spatiale des 3 surfaces d'interaction de hCks1, il est stériquement possible que ces trois sites de liaison soient simultanément engagés dans la liaison de 3 différents ligands.

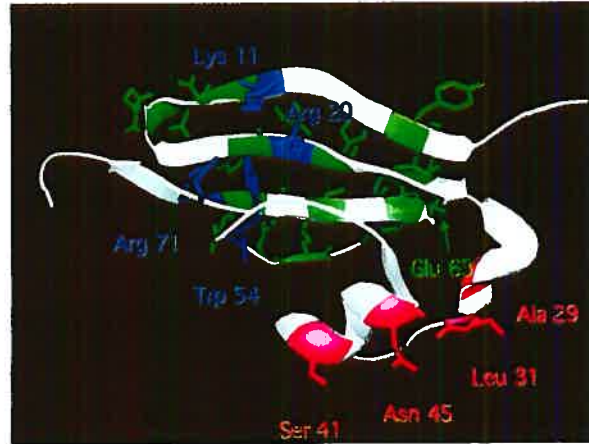


Figure 21 : Structure cristallographique de hCks1 mettant en évidence les 3 surfaces de liaison pour Skp2 (rouge), les CDKs, notamment CDK2 (vert), et les groupements phosphate (bleu). Les acides aminés essentiels à chaque interaction sont précisés (Sitry et al., 2002).

Bien que la communication entre les différentes surfaces fonctionnelles de hCks1 puisse rendre cette protéine très sensible aux mutations au cours de l'évolution, il y a peu de pression évolutive sur la stabilité thermodynamique de ces protéines adaptatrices car elles sont trouvées *in vivo* au sein de complexes macromoléculaires tels que SCF^{Skp2}, et ainsi leur faible stabilité sous forme monomérique est compensée par les multiples liaisons stabilisatrices qu'elles font avec leurs partenaires (Seeliger et al., 2003a). Finalement, le mécanisme d'activation des protéines adaptatrices décrit dans cette section, ce dernier étant basé sur une communication allostérique des différentes surfaces d'interaction de hCks1, assure que le processus d'assemblée de différentes protéines dans un complexe multiprotéique se déroule d'une façon ordonnée, et non aléatoire.

1.4.3 Cinétique d'expression, régulation et localisation subcellulaire

Étant donné l'importance de p27 dans le contrôle du cycle cellulaire, la régulation de l'abondance de la protéine adaptatrice Cks1 dans la cellule doit être stricte et très robuste. Dans des cellules rentrant en quiescence (G0), les niveaux de l'ARNm de Cks1 et l'abondance de la protéine sont tout à fait négligeables. Cependant, lorsque la cellule rentre à nouveau dans le cycle cellulaire, les niveaux d'expression de Cks1 et dans une moindre mesure les niveaux de son ARNm augmentent rapidement à la transition G1/S et durant la phase S, afin de supporter la dégradation de p27^{Kip1} et de permettre ainsi la progression en

phase S. Ces hauts niveaux sont maintenus durant la phase G2 et l'entrée en mitose afin d'activer l'APC/C^{Cdc20}. Finalement, les niveaux de l'ARNm et l'abondance de la protéine diminuent rapidement en fin de mitose (anaphase) pour inactiver ce même complexe APC/C^{Cdc20} et permettre la sortie de la phase M. Ces niveaux sont gardés bas si la cellule quitte le cycle, ou alors durant la première moitié de la phase G1 afin d'éviter une réentrée précoce dans la division cellulaire (Hattori et al., 2003). En contraste, les niveaux de l'ARNm de Cks2 et l'abondance de la protéine sont maximaux uniquement durant une phase transitoire du cycle cellulaire correspondant à la phase G2 (Simon et al., 1995). D'une façon intéressante, la cinétique d'expression de Cks1 au cours du cycle cellulaire est similaire à celle de Skp2, mais totalement inverse à celle de p27 (Fig.22) (Sitry et al., 2002). Ceci est une première évidence de leur coopération dans la dégradation de p27 à la transition G1/S du cycle cellulaire. En plus de cette similitude dans leur cinétique, le fait que l'affinité de Cks1 pour le complexe Skp1-Skp2 est très grande comparée à celle pour CDK2 suggère que Cks1, Skp1 et Skp2 sont assemblés d'une façon permanente au cours de la division cellulaire (Sitry et al., 2002).

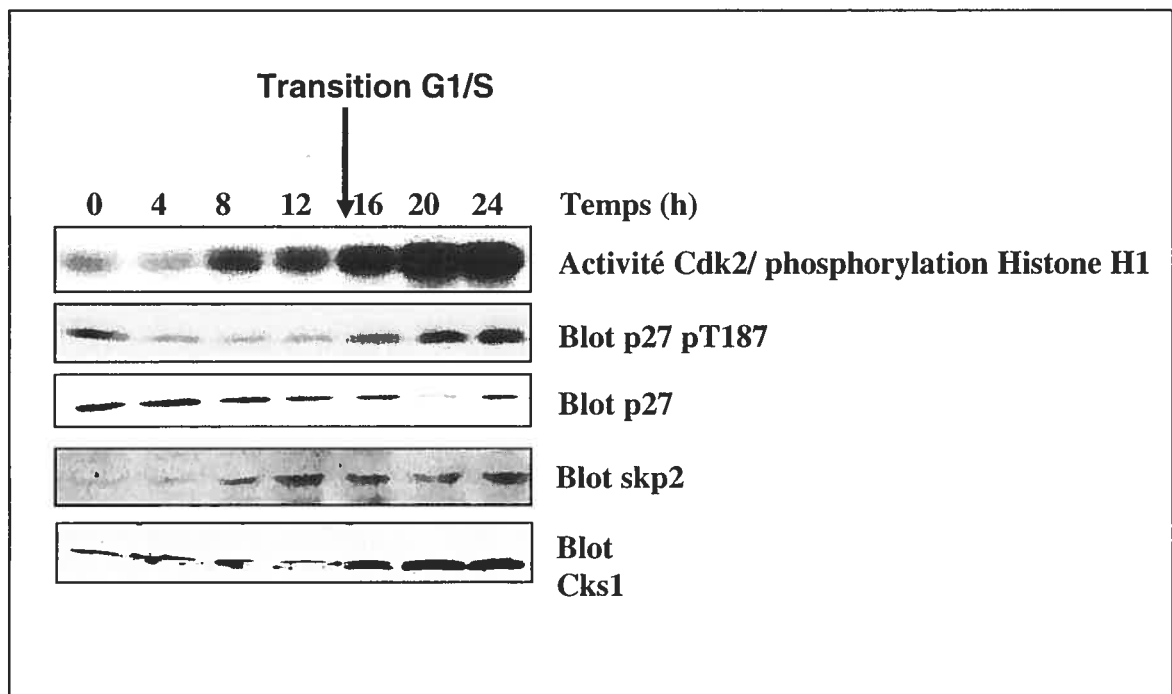


Figure 22 : Cinétiques d'expression des différents partenaires de Cks1 dans la dégradation de p27 à la transition G1/S du cycle cellulaire. On peut remarquer que la cinétique de Cks1 est similaire à celle de Skp2 et inverse à celle de p27 non phosphorylé. Expérience faite dans des cellules Rat-1 (Rodier et al., 2005; Rodier et al., 2001).

En ce qui concerne la régulation transcriptionnelle du gène codant pour Cks1, l'inhibiteur de croissance TGF-béta semble avoir un effet négatif puisqu'un traitement de cellules épithéliales de poumon avec TGF-béta diminue le niveau de l'ARNm de Cks1 alors que ceux d'autres protéines du cycle cellulaire telles que les cyclines G1 D1, D2 et D3 ne changent pas en réponse à ce ligand (Simon et al., 1995). Des expériences de « Northern Blot » confirment cette hypothèse en montrant que TGF-béta diminue les niveaux d'ARNm de hCks1 par 3 à 4 fois dans ces cellules, et ceci d'une façon maximale après 15 heures de traitement (Simon et al., 1995). Ainsi, Cks1 est impliqué dans l'arrêt de croissance de cellules épithéliales suite à un traitement par le TGF-béta. D'un autre côté, le facteur de transcription FoxM1 (Forkhead box M1), dont l'activité est dépendante des voies de signalisation Ras-MAPK, est essentiel à la transcription des gènes codant pour les éléments de spécificité du complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2}, autrement dit Skp2 et Cks1 à la transition G1/S (Wang et al., 2005). En effet, l'inhibition par siRNA de l'expression de FoxM1 dans des cellules U2OS d'ostéosarcome humain cause une diminution significative des niveaux d'ARNm de Cks1 et de l'abondance de la protéine (Wang et al., 2005). Finalement, afin de déterminer si FoxM1 régule directement l'activité transcriptionnelle du gène Cks1, des expériences d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) ont été réalisées. Ces dernières montrent que ce facteur de transcription interagit avec la région proximale du promoteur du gène Cks1, aux environs du nucléotide -200 (Wang et al., 2005).

Le niveau d'expression de Cks1 au cours du cycle cellulaire est régulé non seulement au niveau transcriptionnel mais aussi post-traductionnel via le système protéolytique ubiquitine-protéasome. Cette dépendance pour ce système de dégradation a été suggérée par l'observation que les protéines hCks1 et hCks2 s'accumulent suite à un traitement des cellules avec divers inhibiteurs du protéasome 26S tels que MG132. Cette hypothèse a été confirmée par la détection de protéines Cks1 et Cks2 polyubiquitinées de haut poids moléculaire *in vivo* (Hattori et al., 2003). La protéine Cks1 est dégradée plus rapidement dans des cellules arrêtées en phase M, comparé à des cellules non-synchronisées, ou arrêtées à la transition G1/S du cycle. En effet, la demi-vie de Cks1 est 8h dans des cellules non-synchronisées, supérieure à 16h dans des cellules G1/S, et finalement juste 5h dans des cellules en phase M. Ainsi, la dégradation de Cks1 est dépendante des phases du cycle cellulaire, avec une activité maximale en fin de mitose (Hattori et al., 2003).

Autrement dit, la différence entre les niveaux d'expression de Cks1 en G0/G1 et en S est due à des variations dramatiques dans la stabilité de la protéine. En effet, Cks1 est très instable en G0/G1, mais à la transition G1/S et en S, elle est stabilisée d'une façon conséquente (Bashir and Pagano, 2004). Ainsi, la grande instabilité de Cks1 en G0/G1 est due à sa dégradation protéolytique par le complexe ubiquitine ligase APC/C dont l'activateur est Cdh1 (Bashir et al., 2004). Ceci a été démontré entre autres par le fait qu'un « siRNA » dirigé contre Cdh1 dans des cellules synchronisées en G1 cause la stabilisation de Cks1, et par conséquent l'accélération de la protéolyse de p27 (Bashir et al., 2004). Dans le même temps, il a été démontré que l'acide rétinoïque cause la sous-expression de Cks1 en augmentant sa dégradation par le système ubiquitine-protéasome, ceci causant l'accumulation de p27 et l'arrêt du cycle cellulaire dans une lignée de lymphocytes B immortalisés (Zancai et al., 2005). Il est donc possible que l'acide rétinoïque ait la vertu d'activer l'ubiquitine ligase APC/C^{Cdh1} à un moment où celle-ci cible Cks1. Alternativement, il est possible que Cks1 soit aussi ciblée par une autre E3 ligase pour sa dégradation.

Les substrats de l'APC/C sont souvent caractérisés par la présence d'un motif consensus RxxLxxIxN appelé « D-Box » ou motif de destruction dans leur séquence primaire d'acides aminés. Cependant, il est possible que certains substrats ne possèdent juste que le motif minimal RxxL. Ces deux motifs sont normalement reconnus spécifiquement par les complexes ubiquitine ligase APC/C. Ainsi, Cks1 possède un seul motif RxxL au niveau de son C-terminal, entre les résidus 70 et 73 (Bashir et al., 2004). Lorsque ce motif est muté, la dégradation de Cks1 par l'APC/C^{Cdh1} est inhibée, ceci suggérant que cette région « D-Box » est bien essentielle à cette régulation post-traductionnelle de Cks1 (Bashir et al., 2004). De plus, la construction de différents mutants de Cks1 a montré que cette protéine adaptatrice n'a pas besoin d'interagir avec les CDKs ou Skp2 pour être dégradée par l'APC/C^{Cdh1} (Bashir et al., 2004). Finalement, à la différence de Skp2, le groupe de Pagano a été incapable d'ubiquitiner Cks1 *in vitro* en utilisant l'APC/C^{Cdh1} comme ligase. Ce résultat inattendu suggère qu'un facteur essentiel à la dégradation de Cks1 par cette ligase est manquant dans le système purifié *in vitro*, ou alors que Cks1 n'est pas un substrat direct de l'APC/C^{Cdh1}, et est ainsi ubiquitiné et dégradé par une autre ubiquitine ligase dépendante toute fois de cette forme de l'APC/C (Bashir et al., 2004).

En plus de TGF-béata au niveau transcriptionnel et l'acide rétinoïque au niveau post-traductionnel, d'autres facteurs ont été impliqués dans la régulation de l'abondance de Cks1 au cours du cycle cellulaire. Cependant, les mécanismes de régulation à l'origine de leurs effets n'ont pas été déterminés, et par conséquent, le niveau auquel ces molécules agissent n'est pas connu. Ceci est le cas de l'angiotensine II et du PDGF qui causent la surexpression de Cks1 dans des cellules musculaires lisses d'aorte de rat (Hixon et al., 2000), ou encore de l'oxyde nitrique NO qui réprime l'expression de Cks1 d'environ deux fois dans deux lignées humaines de monocytes (Turpaev et al., 2005).

Hormis la régulation de l'abondance de Cks1 dans la cellule par des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels, l'activité de cette protéine est également régulée par un phénomène de séquestration. En effet, Cks1 interagit avec la forme non-phosphorylée de FRS2 (FGFR substrate 2), ce dernier étant une protéine adaptatrice analogue à IRS1, interagissant avec les différents récepteurs transmembranaires FGFR, et en particulier FGFR1 (Zhang et al., 2004). Ainsi, Cks1, via cette interaction, est séquestré à la membrane plasmique. La phosphorylation du séquestreur FRS2 par la tyrosine kinase de FGFR1 suite à une stimulation par le facteur de croissance FGF cause la relâche de Cks1, ce dernier pouvant alors aller au noyau pour stimuler la dégradation de p27 en vue de l'entrée en phase S (Fig.23) (Zhang et al., 2004).

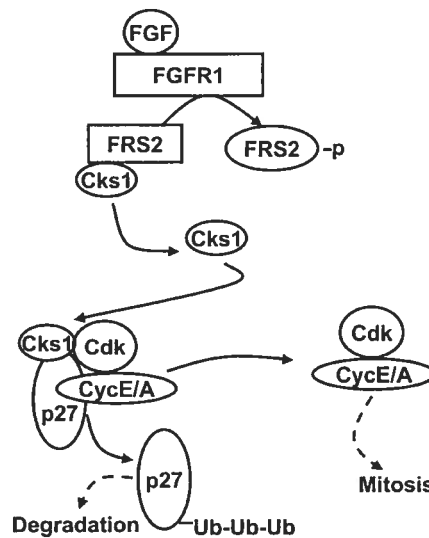


Figure 23 : Schéma reflétant le mécanisme de séquestration FRS2-dépendant régulant l'activité de Cks1 dans le noyau (Zhang et al., 2004).

Ainsi, cette étude révèle un régulateur potentiel de Cks1 en amont, mais surtout une nouvelle voie mitogénique où FGF active FRS2, ce qui entraîne l'activation indirecte Cks1-dépendante des complexes CDK2-cycline E/A essentiels à la transition G1/S du cycle cellulaire. Cependant, ce mécanisme FRS2-dépendant ne peut en aucun cas expliquer la régulation générale de Cks1 par les différents mitogènes.

Finalement, en ce qui concerne la localisation subcellulaire de Cks1, les données sont rares et surtout très controversées. En effet, Wang et al ont montré que des protéines de fusion Cks1-GFP et Cks2-GFP, ces dernières ayant soit un épitope en N- ou en C-terminal, sont distribuées équitablement dans le cytosol et le noyau lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules NIH 3T3 (Zhang et al., 2004). Cependant, d'après un article de Dolcetti, Cks1 localise principalement dans le cytoplasme dans des lignées de lymphocytes B immortalisés, ceci ayant été confirmé par des expériences d'immuno-buvarpage contre Cks1 sur des fractions cytoplasmiques et nucléaires (Zancai et al., 2005). Finalement, Lisztwan et al ainsi que Bashir et Pagano argumentent que Cks1 est trouvé exclusivement dans le noyau dans des cellules U2OS d'ostéosarcome humain (information non publiée de Pagano). Ainsi, il semble probable que la localisation subcellulaire de Cks1 varie en fonction des lignées cellulaires utilisées, ainsi qu'en fonction des stress ou stimuli appliqués. Nous allons adresser cette question au cours de ce travail de maîtrise.

1.4.4 Phénotypes des souris Cks1^{-/-} et Cks2^{-/-}

Les souris Cks1^{-/-} males et femelles sont viables et fertiles. De plus, en comparant avec des souris sauvages contrôle, aucune différence de viabilité ou de santé générale a été répertoriée après un an de vie (Spruck et al., 2001). Néanmoins, une caractéristique frappante des souris Cks1^{-/-} est leur petite taille. En effet, les males et les femelles sont environ 10 à 20% plus petits que les souris contrôle du même genre. Cette différence de taille est apparente dès le jour embryonnaire 13.5 et persiste jusqu'à l'état adulte (Spruck et al., 2001). De plus, les souris hétérozygotes Cks1^{+/-} sont intermédiaire en taille non seulement au stade de l'embryon mais également chez l'adulte, ce qui suggère que Cks1 joue une fonction limitante dans la cellule (Fig.24). Des essais du type « TUNEL » faits sur des sections d'embryon E13.5 révèlent que la petite taille des embryons Cks1^{-/-} n'est pas due à des niveaux élevés d'apoptose (Spruck et al., 2001).

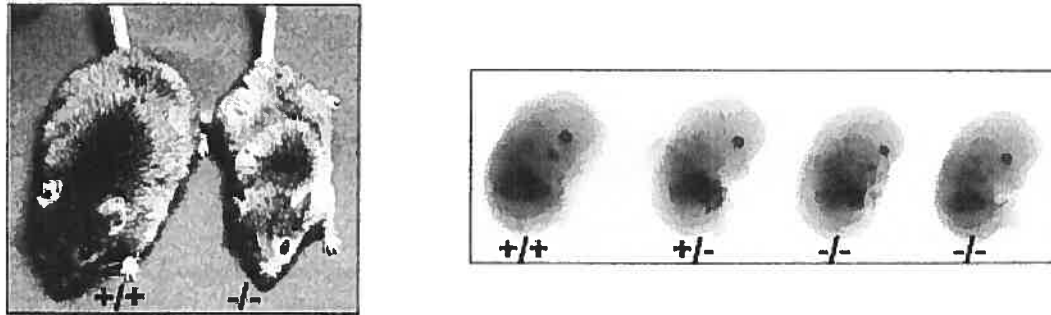


Figure 24 : La plus petite taille des souris $Cks1^{-/-}$ est observée non seulement au stade embryonnaire (E13.5) (à droite), mais également chez l'adulte (à gauche). On peut remarquer aussi la taille intermédiaire des embryons hétérozygotes (Spruck et al., 2001).

D'un autre côté, les fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) $Cks1^{-/-}$ prolifèrent plus lentement et rentrent en sénescence beaucoup plus tôt que des MEFs sauvages. De plus, une fois immortalisés, ces MEFs $Cks1^{-/-}$ montrent une densité à saturation beaucoup plus basse que les MEFs sauvages (Spruck et al., 2001). Ainsi, ces MEFs $Cks1^{-/-}$ semblent avoir une capacité réduite à proliférer lorsque des signaux antiprolifératifs sont activés comme dans le cas de l'inhibition de contact, ou alors lorsque des signaux prolifératifs sont inhibés ou réduits comme dans le cas d'une diminution de la concentration de sérum. L'incapacité des MEFs $Cks1^{-/-}$ à proliférer dans des conditions mitogéniques limitantes est probablement due aux mêmes défauts moléculaires qui causent une croissance plus lente des embryons mutants, et la plus petite taille des souris nullizygotes adultes.

D'une façon surprenante, les souris $Cks1^{-/-}$ ne présentent aucun défaut mitotique, ce qui était pourtant attendu du fait du rôle essentiel de $Cks1$ dans l'entrée et la sortie de mitose dans différents organismes eucaryotes. Ceci est probablement dû à un chevauchement fonctionnel entre les protéines $Cks1$ et $Cks2$. Cependant, ces souris $Cks1^{-/-}$ sont incapables de dégrader le CKI $p27^{Kip1}$ essentiel à la régulation de la transition G1/S (Spruck et al., 2001). En effet, les cellules $Cks1^{-/-}$ ainsi que les embryons mutants accumulent de hauts niveaux de $p27$ et cycline E comparées aux MEFs sauvages et hétérozygotes (Fig.25) (Spruck et al., 2001).

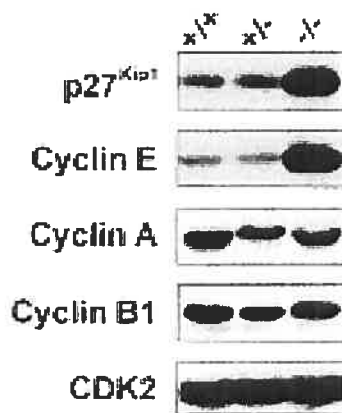


Figure 25 : Niveaux d'expression de différents régulateurs du cycle cellulaire dans plusieurs lignées de MEFs non-synchronisées. On peut y voir l'accumulation de p27 et cycline E dans les MEFs $Cks1^{-/-}$ (Spruck et al., 2001).

Des extraits cellulaires $Cks1^{-/-}$ sont déficients dans l'ubiquitination de p27, ceci expliquant moléculairement l'accumulation de ce CKI observée dans ces MEFs mutantes (Spruck et al., 2001). Cependant, l'accumulation de la cycline E observée dans ces mêmes cellules est un phénotype qui est secondaire à l'accumulation de p27, plutôt qu'un défaut intrinsèque dans son ubiquitination (Spruck et al., 2001). Les phénotypes de petite taille et d'accumulation de p27 observés chez les souris $Cks1^{-/-}$ sont similaires à ceux présents dans les souris $Skp2^{-/-}$ (Nakayama et al., 2000). Ainsi, en plus de leur cinétique d'expression similaire au cours du cycle cellulaire, la similarité de leur phénotype, en particulier pour les deux aspects mentionnés ci-dessus, est une autre évidence de leur coopération dans la dégradation de p27. Il existe également d'autres similarités phénotypiques entre les souris $Cks1^{-/-}$ et $Skp2^{-/-}$, entre autres, l'accumulation de larges noyaux polyploïdes dans des tissus tels que le foie (Spruck et al., 2001). Le phénotype des souris $p27^{-/-}$ est opposé à celui des souris $Cks1^{-/-}$ et $Skp2^{-/-}$. En effet, ces souris sont caractérisées non pas par une petite taille, mais plutôt par un gigantisme dû à l'hyperprolifération de nombreux tissus (voir section 1.2.2 du mémoire) (Nakayama et al., 1996).

$Cks2$, malgré la haute homologie de séquence avec $Cks1$, est incapable de supporter l'ubiquitination de p27. Ainsi, le fait que les souris et les cellules $Cks2^{-/-}$ ne présentent aucun des phénotypes physiques et moléculaires associés avec une accumulation de p27 n'est pas inattendu (Spruck et al., 2001). Cependant, les souris $Cks2^{-/-}$ sont stériles indépendamment du sexe (Donovan and Reed, 2003). Cette stérilité est due à l'incapacité des cellules germinales males et femelles de progresser dans la méiose après la métaphase

I ; autrement dit, un blocage à la transition métaphase-anaphase lors de la première division méiotique caractérise les gamètes $Cks2^{-/-}$ (Donovan and Reed, 2003). La viabilité des souris $Cks1^{-/-}$ et $Cks2^{-/-}$ couplée avec la mortalité des animaux double « knock out » $Cks1^{-/-}Cks2^{-/-}$ suggèrent que ces protéines ont des fonctions largement redondantes (Donovan and Reed, 2003). Néanmoins, bien que la stérilité spécifique des souris $Cks2^{-/-}$ suggère une fonction non-redondante de $Cks2$ à la méiose, le fait que la microinjection d'ARNm de $Cks1$ dans des oocytes $Cks2^{-/-}$ récupère le phénotype méiotique à la transition métaphase I-anaphase laisse penser le contraire, et suggère plutôt que $Cks1$ n'est pas exprimé dans les gamètes, à la différence de $Cks2$ (Spruck et al., 2003). L'importance biologique de cette exclusion de $Cks1$ des gamètes n'est pas encore claire. Cependant, un mécanisme possiblement évolué par les cellules méiotiques pourrait être de prévenir la réentrée dans le cycle cellulaire après la métaphase I en utilisant exclusivement le seul homologue des protéines Cks ne pouvant pas cibler les régulateurs de la transition G1/S tels que p27 ou p130 pour leur dégradation via le protéasome 26S, autrement dit $Cks2$ (Donovan and Reed, 2003)

1.4.5 Implications de $Cks1$ dans le cancer

La dégradation incontrôlée de $p27^{Kip1}$ due à des niveaux élevés des sous-unités $Cks1$ et $Skp2$ du complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2} , et les faibles niveaux d'expression résultants de ce CKI sont observés dans de nombreux cancers humains très agressifs. Vu son rôle essentiel dans la dégradation de p27 à la transition G1/S, $Cks1$ peut être considéré comme un nouveau proto-oncogène étant potentiellement amplifié ou surexprimé dans de nombreuses tumeurs humaines. Jusqu'à récemment, les études menées pour déterminer l'expression de $Cks1$ dans les cellules cancéreuses ont été ralenties du fait de la non-disponibilité d'anticorps spécifiques pour $Cks1$ ne réagissant pas avec la protéine homologue $Cks2$. Depuis, de nombreuses études mettant en évidence l'importance de la surexpression de $Cks1$ dans la diminution de p27 et le développement tumoral ont été réalisées. Tout d'abord, dans différentes formes de cancer du poumon humain, les tumeurs sont caractérisées par des hauts niveaux d'ARNm et d'expression de $Cks1$, comparé à ceux observés dans les tissus sains adjacents (Inui et al., 2003). Cependant, d'une façon

surprenante, dans ces carcinomes pulmonaires, la surexpression de Cks1 ne corrèle pas avec la sous-régulation de p27 (Inui et al., 2003).

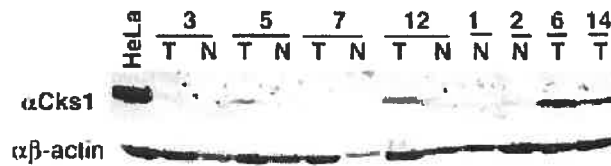


Figure 26 : Surexpression de Cks1 dans des tissus tumoraux (T) de poumon versus des tissus sains adjacents (N) (Inui et al., 2003).

Dans une autre étude sur des lignées cancéreuses humaines de poumon surexprimant Cks1, il a été montré que la transfection d'un siRNA contre Cks1 réduit l'activité kinase de CDK1 de 30%, induit un arrêt en G2/M, et finalement cause l'entrée en apoptose de ces cellules cancéreuses (Tsai et al., 2005). Dans le même temps, ce siRNA n'a pas affecté la viabilité de fibroblastes normaux de poumon (Tsai et al., 2005). Ainsi, il semble pertinent de considérer la technologie d'interférence à l'ARN comme une nouvelle forme de thérapie génique anti-cancer. En effet, étant donné que les tissus sains adjacents aux tumeurs montrent une faible expression basale de Cks1 comparé aux cellules cancéreuses, un siRNA contre cette protéine pourrait potentiellement affecter spécifiquement les tumeurs, et avoir que très peu d'effets néfastes sur les cellules saines avoisinantes (Tsai et al., 2005).

D'un autre côté, à partir d'études faites sur des échantillons de carcinomes colorectaux, de nombreuses corrélations avec la surexpression de Cks1 ont été observées. En effet, dans ces tumeurs, à la différence des carcinomes pulmonaires, les niveaux d'expression de Cks1 corrèlent directement avec ceux de Skp2, mais inversement à ceux de p27. Ainsi, la surexpression de Cks1 peut avoir un rôle causatif important dans la baisse des niveaux de p27 chez des patients atteints de carcinomes colorectaux agressifs (Shapira et al., 2004). De plus, dans ces cancers, des corrélations entre la surexpression de Cks1 et la perte de différenciation des tumeurs, un stade avancé de la maladie ainsi qu'une diminution des chances de survie des patients ont été établies (Shapira et al., 2004; Shapira et al., 2005). Par conséquent, les niveaux d'expression de Cks1 constituent un marqueur pronostique robuste et indépendant, au même titre que les niveaux d'expression de Skp2 et p27.

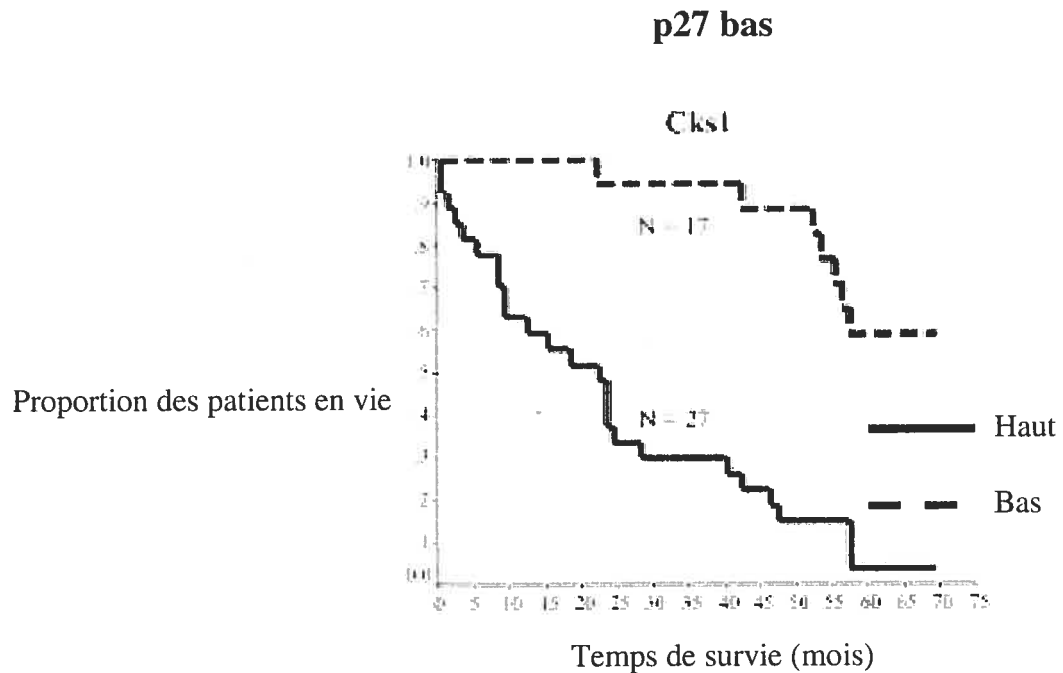


Figure 27 : Chez des patients atteints de carcinomes colorectaux, la surexpression (haut) de Cks1 est associée avec un temps de survie diminué lorsque p27 est bas (Shapira et al., 2005).

La découverte de nouveaux marqueurs pronostiques indépendants et robustes tels que les niveaux d'expression de Cks1 ou Skp2 peut permettre de mieux comprendre le comportement et la biologie d'une tumeur, et par conséquent, les traitements peuvent être plus appropriés et les chances de survie augmentées (Shapira et al., 2004). Ceci est vrai en particulier pour les patients dans un stade intermédiaire du cancer (stade II ou III), où les marqueurs pronostiques couramment disponibles (niveaux de p27, niveau de différenciation des tumeurs) ne fournissent pas toujours des informations suffisamment précises sur la nature de la tumeur (Shapira et al., 2004). L'importance de découvrir des nouveaux marqueurs biologiques du cancer est renforcée par le fait que des variations dans les niveaux d'expression de protéines régulatrices du cycle cellulaire telles que Cks1 peuvent permettre d'expliquer les différences dans le comportement des tumeurs et le temps de survie chez des patients ayant des caractéristiques cliniques et histologiques similaires (Shapira et al., 2005). D'autres études ont montré que les corrélations observées vis-à-vis de Cks1 pour les carcinomes colorectaux sont également vraies pour des carcinomes de la cavité orale (Kitajima et al., 2004), ou du sein (Slotky et al., 2005). La pertinence de la technologie d'interférence à l'ARN en tant que thérapie anti-cancer est à nouveau soulignée

par le fait qu'un traitement de cellules cancéreuses de la cavité orale avec un siRNA dirigé contre Cks1 cause l'accumulation de p27 et l'inhibition subséquente de la croissance des ces cellules par un arrêt en phase G1 (Kitajima et al., 2004). D'un autre côté, suite à des études d'immunohistochimie, il a été montré que des tumeurs ovariennes à faible et à fort potentiel invasif peuvent être distinguées par leur expression de la protéine Cks1 (Ouellet et al., 2005). Ainsi, Cks1 se révèle être un bon marqueur biologique pour déterminer le type de tumeur ovarienne chez des patients.

Un mécanisme pouvant potentiellement expliquer la surexpression de Cks1 et Skp2 dans de nombreux cancers humains est la dérégulation de leur dégradation par le complexe APC/C^{Cdh1}. Ceci pourrait être dû à des mutations « perte de fonction » dans certaines sous-unités du complexe APC/C, ou alors à des mutations stabilisatrices dans les « D-Box » de Cks1 ou Skp2, ces dernières leur permettant de ne pas être reconnues par leur ubiquitine ligase APC/C^{Cdh1} (Kitajima et al., 2004). Un autre mécanisme pouvant causer la surexpression de Cks1 et Skp2 dans les cancers est un gain de fonction de la voie Ras/Raf/Mek/Erk causant une activation constitutive du facteur de transcription FoxM1, et par conséquent, une augmentation importante de la transcription des gènes codant pour ces deux sous-unités de l'ubiquitine ligase SCF^{Skp2-Cks1} (Wang et al., 2005). Sachant qu'uniquement 2 acides aminés, Ser41 et Asn45, sont essentiels à l'interaction de Cks1 avec Skp2, il a été montré qu'une forme mutante de Cks2 du type Cks2 E41S R45N est capable de lier Skp2 et de supporter l'ubiquitination de p27, à la différence de la forme sauvage (Seeliger et al., 2003a). Ainsi, une telle mutation, bien que très peu probable, pourrait potentiellement causer la dégradation incontrôlée de p27 d'une façon Cks1-Cks2-dépendante dans certains cancers humains, et ce mécanisme pourrait être considéré comme une alternative à la surexpression de Cks1 dans les modes observés de développements tumoraux (Seeliger et al., 2003a).

Finalement, vu le nombre de cancers caractérisés par une sous-régulation de p27 due à sa dégradation protéolytique incontrôlée par l'ubiquitine ligase SCF^{Skp2-Cks1}, Skp2 et Cks1 sont de plus en plus étudiées dans divers cancers humains et considérées comme des cibles anti-cancer potentielles. Ainsi, le groupe de Vassilev a réalisé un criblage à haut débit pour des petites molécules inhibitrices de l'interaction Cks1-Skp2 (Huang and Vassilev, 2005). Ces molécules pourraient ainsi enrayer la dégradation de p27 et bloquer la prolifération

incontrôlée de certains cancers (Huang and Vassilev, 2005). Via leur criblage, ils ont identifié plusieurs composés ayant un IC_{50} (Inhibitory concentration 50) inférieur à 20 micromolaires pour l'interaction Cks1-Skp2 (Huang and Vassilev, 2005). Étant donné que la constante de dissociation K_d du complexe Cks1-Skp2 est de 140nM, ces composés sont considérés comme des molécules de départ de choix pour développer des inhibiteurs de plus grande affinité (Huang and Vassilev, 2005).

2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Puisque la majorité des protéines, et en particulier les régulateurs du cycle cellulaire sont régulés par phosphorylation, il est probable que l'adaptateur Cks1 soit régulé de cette façon au cours de la division cellulaire.

Ainsi, l'un des principaux objectifs de cette étude est de démontrer si Cks1 est phosphorylé *in vivo*. Dans le cas échéant, il sera essentiel d'identifier précisément les acides aminés phosphorylés sur cette protéine. Ensuite, à l'aide de différents mutants non-phosphorylables de Cks1, le deuxième objectif sera de caractériser ce ou ces sites de phosphorylation. Tout d'abord, nous avons l'intention d'étudier si la perte de ces sites cause des changements dans l'interaction de Cks1 à la transition G1/S avec ses différents partenaires du complexe SCF^{Skp2}, notamment Skp2, p27^{Kip1} et la kinase CDK2. De plus, il sera intéressant de déterminer la localisation subcellulaire de la protéine sauvage et des différents mutants non-phosphorylables ou phosphomimétiques de Cks1. Pour finir la caractérisation de ces sites de phosphorylation sur Cks1, nous devons étudier leurs cinétiques en fonction des phases du cycle cellulaire. Finalement, afin de caractériser l'impact physiologique de cette ou ces modifications post-traductionnelles, nous essaierons de développer un essai fonctionnel mettant en évidence l'importance de ces sites.

3. RÉSULTATS – ARTICLE

“Characterization of two phosphorylation sites on Cks1 in the context of p27^{Kip1} degradation: the serines 2 and 51”

Liste des auteurs, en ordre :

Geoffrey Bilon
Geneviève Rodier
Sylvain Meloche

Article soumis à: Non déterminé

Characterization of Two Phosphorylation Sites on Cks1 in the Context of p27^{Kip1} Degradation: the Serines 2 and 51*

Geoffrey Bilon^{1,2}, Geneviève Rodier¹, and Sylvain Meloche^{1,2,3}

¹Institut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC), ²Department of Pharmacology, and ³Department of Molecular Biology, Université de Montréal, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada

Running title: Phosphorylation of the cell cycle adaptor Cks1

Correspondence to Sylvain Meloche: 

SUMMARY

The abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} during the G1/S transition of the cell cycle is controlled primarily by its proteolytic degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. The phosphorylation of p27 on threonine 187 by the cyclinE-Cdk2 and cyclinA-Cdk2 complexes is a prerequisite to its recognition and subsequent ubiquitination by the ubiquitin ligase SCF^{Skp2}. p27 ubiquitination is characterized by its absolute dependence on the adaptor protein Cks1. This mammalian member of the Suc1/Cks protein family is absent from quiescent cells, and its expression is induced by growth factors. Moreover, Cks1 is overexpressed in several human cancers, including lung and colorectal carcinomas. All these observations emphasize the importance of elucidating the mechanisms regulating Cks1 during the cell cycle. Protein phosphorylation regulates several aspects of the G1/S transition. In this study, we demonstrate by ³²P metabolic labeling and 2D phosphopeptide maps that Cks1 is phosphorylated on serines 2 and 51 *in vivo*. We show here that the loss of these phosphorylation sites has an impact on the interaction of Cks1 with the E3 ubiquitin ligase Skp2 and the CDK inhibitor p27. However, the non-phosphorylatable Cks1 mutants behave as the wild type protein with regard to their interaction with Cdk1 and Cdk2. Finally, the subcellular localization of these mutants diverges from that of wild type Cks1. The Cks1 mutant proteins S2A, S51A and especially S2A-S51A are sequestered into the cytoplasm of Rat1 cells. In conclusion, all these results show that these phosphorylations are crucial for the adapter function of Cks1 at the G1/S transition of the cell cycle.

Keywords: p27^{Kip1}, SCF^{Skp2}, Cks1, degradation, phosphorylation.

INTRODUCTION

The eukaryotic cell cycle is positively regulated by the sequential activity of cyclins - cyclin dependent kinases (Cdks)⁽¹⁾ complexes, and negatively regulated by a protein family called Cdk inhibitors or CKIs⁽¹⁾ (Russo et al., 1996; Sherr and Roberts, 1999). Although the CKI p27^{Kip1} inhibits the cyclin D/E/A-Cdks complexes by forming inactive heterotrimeric complexes, its principal target remains the cyclin E-Cdk2 complex essential for the G1/S transition of the cell cycle (Russo et al., 1996; Sherr and Roberts, 1999; Vidal and Koff, 2000). Thus the ectopic expression of p27^{Kip1} causes cell cycle arrest in G1 due to the inhibition of the cyclin E-Cdk2 and cyclin A-Cdk2 complexes (Polyak et al., 1994a; Toyoshima and Hunter, 1994). The organomegaly characterizing the p27^{-/-} mice emphasizes the major role of this CKI in cellular differentiation and proliferation (Nakayama et al., 1996). Moreover the fact that the p21^{-/-} and p57^{-/-} mice do not present the phenotype of cell cycle deregulation observed in p27^{-/-} mice suggests that p27^{Kip1} is the major CKI responsible for the control of cell growth at the G1/S transition (Nakayama et al., 2001). Along the cell cycle, the abundance of p27^{Kip1} depends on the sum of its synthesis and proteolytic degradation. As a result, while its synthetic rate remains constant, the drastic decrease in the levels of p27 at the G1/S transition is explained by its rapid proteolysis via the ubiquitin-proteasome pathway (Pagano et al., 1995). The first step in this degradation process consisting in the ligation of ubiquitin molecules to the targeted substrate is mediated by the successive activity of three enzymes: the E1 or ubiquitin-activating enzyme, the E2 or ubiquitin-conjugating enzyme, and finally the E3, which is the ubiquitin ligase conferring specificity to the system. Next, the polyubiquitin chain present on the targeted protein is rapidly recognized by the 26S proteasome for its proteolytic degradation (Pickart, 2001).

To date, SCF^{Skp2-Cks1} (1) and KPC (1) were identified as the major two ubiquitin ligases targeting p27^{Kip1}. The KPC complex mediates p27 degradation in the cytoplasm during the G1 phase, while the ubiquitin ligase SCF^{Skp2-Cks1} ensures its proteolysis in the nucleus during the G1/S, S and G2 phases of the cell cycle in order to maintain the activation of the cyclin E/A-cdk2 complexes (Ganoth et al., 2001; Kamura et al., 2004; Rodier et al., 2001;

Spruck et al., 2001). Unlike KPC, the phosphorylation of p27^{Kip1} on threonine 187 by the above mentioned cyclin-Cdk complexes is a prerequisite to its recognition and subsequent ubiquitination by the ubiquitin ligase SCF^{Skp2-Cks1}. The loss or the decrease of p27 expression due to its uncontrolled degradation by the ubiquitin-proteasome pathway is observed in approximately 50% of human cancers (Slingerland and Pagano, 2000).

SCF complexes consist of 3 invariant subunits (Skp1, Cul1, Rbx1) and a variable specificity factor known as the F-box protein. More precisely, Cullin-1 serves as a molecular scaffold on which Skp1 and Rbx1 assemble. Rbx1 interacts with the E2 enzyme, while Skp1 associates with the F-box protein via its F-box motif. Furthermore, the F-box proteins of the SCF complexes bind their specific phosphorylated substrates through their protein-protein interaction domain such as LRR (leucine-rich-repeats) in the case of Skp2 (Cardozo and Pagano, 2004). Among SCF ubiquitin ligases, SCF^{Skp2} is unique through its absolute dependence on the adaptor protein Cks1 for p27^{Kip1} ubiquitination (Ganoth et al., 2001; Spruck et al., 2001). This is confirmed by the fact that cellular extracts from Cks1^{-/-} MEFs are deficient in p27 degradation (Spruck et al., 2001).

The proteins of the Suc1/Cks family, which are highly conserved among eukaryotes, were initially discovered in the yeasts *S. pombe* and *S. cerevisiae* as genetic suppressors of mutations in the Cdk1 gene (Hadwiger et al., 1989; Hayles et al., 1986). In 1990, the two human homologues of the yeast Cks1 gene were cloned and designated hCks1 and hCks2 for Cdc kinase subunit or Cdk subunit. These genes encode two distinct proteins of 79 amino acids, whose molecular weight is approximately 9 KDa (Richardson et al., 1990). Both hCks1 and hCks2 are capable of functionally substituting Cks1 in the yeast *S. cerevisiae* (Richardson et al., 1990). Moreover, the viability of the Cks1^{-/-} and Cks2^{-/-} mice coupled with the mortality of the double knock-out animals emphasize that these proteins have highly redundant functions (Donovan and Reed, 2003). The Cks proteins are described as cell cycle regulators having the potential of interacting with high affinity with certain Cdks, especially Cdk1 and Cdk2. However, upon binding to Cdks, these proteins do not play the role of activators or inhibitors, but rather modulate the recognition of specific substrates by these cyclin-dependent kinases (Harper, 2001). A surprising observation is the impossible substitution of Cks1 by Cks2 within the SCF^{Skp2} ubiquitin ligase despite the 81% homology between these two proteins (Spruck et al., 2001). Recently, it was suggested

that the role of mammalian Cks1 in p27 degradation may be conserved in other eukaryotic organisms. Indeed, in *D. melanogaster*, Cks85A interacts with the homologue of hsSkp2 (Giot et al., 2003). Being implicated in the degradation of p27^{Kip1}, Cks1 is a proto-oncogene, whose expression must be tightly monitored. Thus in addition to transcriptional and post-translational control mechanisms (Bashir et al., 2004; Wang et al., 2005), the activity of Cks1 is also regulated by FRS2⁽¹⁾-dependent sequestration at the plasma membrane (Zhang et al., 2004). Nevertheless several studies revealed Cks1 overexpression and the resulting decrease in p27 levels in several human cancers (Inui et al., 2003; Kitajima et al., 2004; Slotky et al., 2005; Tsai et al., 2005). Furthermore, in colorectal carcinomas, correlations between Cks1 overexpression, loss of tumor differentiation, and diminished chances of survival were established (Shapira et al., 2004; Shapira et al., 2005). While all Cks proteins possess a Cdk and a phosphate binding domains (Arvai et al., 1995; Bourne et al., 1996), mammalian Cks1 possesses a unique Skp2 binding domain around its two alpha-helices, which is responsible for its specific role within the SCF^{Skp2} complex (Sitry et al., 2002). These three binding sites on mammalian Cks1 are essential for the high affinity interaction of pThr-187-p27 with Skp2, and for its subsequent ubiquitination (Sitry et al., 2002). Very recently, the crystallographic structure of the quaternary complex Skp1-Skp2-Cks1-p27 phosphopeptide revealed that Cks1 is not just an adaptor, but rather is highly involved in the interaction of SCF^{Skp2} with pThr-187-p27 (Hao et al., 2005). Indeed, the phosphate group present on the threonine 187 of p27, which is the degradation signal of this CKI, interacts exclusively with Cks1, and makes hydrogen bonds networks with not only the lateral chains of residues Lys11, Arg20, Ser51 and Trp54, but also with the nitrogen atom located on the main chain of Ser51 (Hao et al., 2005). Here we demonstrate that serines 2 and 51 are phosphorylated *in vivo* on Cks1, and that these phosphorylations sites are crucial for the role of this protein in the degradation of p27 at the G1/S transition of the cell cycle.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture and Transfections

NIH 3T3 fibroblasts and Rat-1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% calf serum and antibiotics. HEK 293 cells were cultured in minimum essential medium containing 10% fetal bovine serum plus antibiotics. For transfection, Rat-1 cells were plated onto glass coverslips at a density of 120,000 cells per well of 6-well plates. After 3 hours allowing cell adhesion, the cells were transiently transfected with FuGENE 6 reagent (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. The total amount of transfected plasmid DNA was 2 micrograms per well. After having changed the medium 6 hours post-transfection, the cells were cultured for an additional 48 h and then harvested for immunofluorescence as described below. After being plated to 50% density and allowed to grow overnight, HEK293 cells were transiently transfected by the calcium phosphate precipitation method. The total amount of transfected plasmid DNA was 12 micrograms per 100mm Petri dish. NIH3T3 cells were transiently transfected with LipofectAMINE reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The total amount of transfected plasmid DNA was 12 micrograms per 100mm Petri dish.

Antibodies

Polyclonal antibodies directed against Myc (A14), HA (Y11), FRS2 (H91), Cdk2 (M2), and monoclonal antibody directed against Myc (9E10) for immunofluorescence were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. mAb to Cdk1 (C12720) was purchased to Transduction Laboratories. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-mouse was obtained from Jackson Immunoresearch, and finally HRP anti-goat TrueBlot comes from BD Biosciences.

DNA constructs, mutagenesis, and cDNA cloning

All recombinant Cks1 DNA constructs were derived from the human cDNA (Richardson et al., 1990). The human Cks1 cDNA (purchased from ATCC) was ligated into the EcoRI-

XbaI sites of Myc6-pcDNA3 expression vector (Coulombe et al., 2004). In order to remove the serine produced by the EcoRI site, all the mutant and wild-type Cks1 cDNAs (encoding WT, S2A, S9A, S39A, S41A, S51A and S2-51A Cks1 proteins) were next ligated into the NcoI-XbaI sites of Myc5-pcDNA3 after removal of the sixth Myc tag from Myc6-pcDNA3. These mutations were introduced into Cks1 cDNA using either the Altered Sites *in vitro* mutagenesis system (Promega) for S9A, S39A, S41A and S51A constructs, or PCR amplification for S2A and S2-51A constructs. All mutations were confirmed by DNA sequencing. The methods used to design the p27-HA and HA-Skp2 constructs were described previously (Rodier et al., 2005; Rodier et al., 2001). The rat FRS2 cDNA from the FRS2-Myc-His6 construct (provided kindly by Dr. Heath, from the School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham) was ligated into the EcoRI site of HA-pcDNA3-GST expression vector (P. Coulombe and S. Meloche, unpublished data). Human Cks2 cDNA was cloned from the Human Whole Brain Quick Clone cDNA Library (BD Biosciences) by PCR amplification using specific Cks2 primers according to the manufacturer's instructions. The mutant Cks2 cDNA (encoding the A2S Cks2 protein) was obtained by PCR amplification using a mutated forward Cks2 primer. The wild-type and mutant Cks2 cDNAs were ligated into the NcoI-XbaI sites of Myc5-pcDNA3.

***In vivo* phosphorylation analysis, phosphopeptide mapping and phospho-amino-acids analysis (PAA)**

For phosphorylation analysis of ectopically expressed wild-type and mutant Cks1 proteins, exponentially growing NIH3T3 fibroblasts or HEK293 cells were labeled 48 h after transfection for 5 hours in bicarbonate and phosphate-free HEPES-buffered MEM containing 0.5 mCi/ml [³²P] phosphoric acid and 10% dialyzed calf serum. The cells were then washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in Triton X-100 lysis buffer (Servant et al., 2000). After clarification, the lysates were incubated for 4 h at 4°C with 3 microlitres of anti-Myc antibody 9E10 pre-adsorbed on protein A-Sepharose beads (Pharmacia). The immune complexes were washed with Triton X-100 lysis buffer and fractionated by SDS-PAGE. The proteins were then transferred to PVDF membranes and visualized by autoradiography. Phosphopeptide mapping and phospho-amino-acids analysis were performed as described previously (Fleurent et al., 1997).

Immunoblot analysis, immunoprecipitation and co-immunoprecipitation

Cell lysis, and immunoblot analysis were performed as described previously (Servant et al., 2000). For co-immunoprecipitation assays, transfected or cotransfected cells were lysed in NP-40 lysis buffer (50mM Tris pH 7.5, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% NP40, 10mM NaF, 0.2mM sodium ortho-vanadate, 1mM dTT, 0.1mM PMSF, 1microgram/ml leupeptine, and 1micromolar pepstatinA), and the resulting lysates were incubated for 2h at 4°C with 3 microlitres of anti-Myc 9E10 antibody, while the proteinA-Sepharose beads were blocked at 4°C with TNET-BSA (Tris 50mM pH 7.4, NaCl 100mM, EDTA 5mM, Triton X-100 0.5%, and BSA 1%). The lysates along with the anti-Myc antibody were then incubated with the blocked proteinA-Sepharose beads for 1h at 4°C. After 5 washes with the NP-40 lysis buffer, the precipitated proteins were fractionated by SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with Myc (A14), HA (Y11), FRS2 (H91), Cdk2 (M2) and Cdk1 specific antibodies.

Immunofluorescence studies

Rat-1 cells grown on glass coverslips were washed twice with ice-cold PBS, and then fixed with 3.7% paraformaldehyde/PBS for 20 minutes at 37°C. After quenching in 0.1 M glycine/PBS for 5 min, the cells were permeabilized by incubation in 0.1% Triton X100/PBS for 5 min at room temperature, and then blocked in 1% bovine serum albumin/PBS for 1 h at 37°C or overnight at 4°C. For detection of ectopically expressed wild-type and mutant Myc5-Cks1 proteins, the cells were stained for 1 hour at 37°C with anti-Myc 9E10 primary antibody (dilution 1: 50), followed by incubation with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse IgG (dilution 1: 100) for 1 hour at 37°C. Cell nuclei were stained with DAPI during 5 minutes at room temperature. Cell samples were viewed by fluorescence microscopy (Leica DM RB). A minimum of 150 cells were scored for each coverslip. The results are expressed as the percentage of cells showing either cytoplasmic or nucleocytoplasmic staining.

RESULTS

Cks1 is phosphorylated on serines 2 and 51 *in vivo*

Since protein phosphorylation regulates several aspects of the G1/S transition of the cell cycle, we have analyzed the phosphorylation state of ectopically expressed wild-type Myc6-Cks1 protein in exponentially growing NIH3T3 fibroblasts. Results of *in vivo* ^{32}P labeling studies indicated that exogenous Cks1 is phosphorylated in these experimental conditions (Figure 1A). Analysis of tryptic phosphopeptide maps revealed that Myc6-Cks1 protein is phosphorylated on five major spots (Figure 1B, spots 1 to 5). Following phosphoamino acid analysis, the five major labeled peptides were found to contain exclusively phosphoserines (Figure 1C).

A site-directed mutagenesis approach was used to identify the phosphorylation sites in Cks1. Since there are only 5 serines in this protein (serine 2, 9, 39, 41, and 51), we decided to mutate each of them into alanine. We used HEK293 cells for the phosphorylation analysis of the different Cks1 mutants. HEK293 cells were transfected with expression vectors encoding wild-type or alanine mutants of Myc5-tagged Cks1, metabolically labeled with [^{32}P] orthophosphate, and the different ectopically expressed Cks1 proteins were immunoprecipitated with anti-Myc antibody. The extent of phosphorylation of wild-type, S2A, S9A, S39A, S41A and S51A Myc5-Cks1 was analyzed by autoradiography and normalized to the expression levels of the different Cks1 proteins in control lysates. As shown in Figure 1D, replacement of Ser51 by Alanine in the S51A Cks1 mutant resulted in a very strong reduction in ^{32}P incorporation, indicating that Ser51 is a major site of Cks1 phosphorylation. No significant change in the total level of Myc5-Cks1 phosphorylation was observed for all the other Cks1 S to A mutants. Thus, serine 2, 9, 39 and 41 do not seem to be significant phosphorylation sites for Cks1 (Figure 1D and data not shown). The phosphopeptide map of wild-type Myc5-tagged Cks1 in HEK293 cells was quite comparable to that of wild-type Myc6-tagged Cks1 in NIH3T3 fibroblasts, with the

conserved presence of the five major phosphopeptides (Figures 1B and E). As expected, the two-dimensional map of the Cks1 mutant S51A was characterized by the loss of the major phosphopeptide when compared to that of the wild-type protein (Figure 1E). This result confirms that Cks1 is phosphorylated on Ser51 *in vivo*. However, surprisingly, while the 2-D maps of the Cks1 mutants S9A, S39A and S41A were exactly similar to the wild-type one, confirming the non-phosphorylation of these serines (data not shown), we observed that the map corresponding to the S2A mutant loses a doublet of minor phosphopeptides (Figure 1E). Thus, in addition to Ser51, Cks1 is phosphorylated on Ser2 *in vivo*. The fact that no significant change in the total level of Myc5-Cks1 phosphorylation was observed for the Cks1 S2A mutant, unlike the S51A mutant, can be explained by the much lower intensity of labeled peptides containing phospho-serine 2, compared to the one containing phospho-serine 51 (Figures 1D and E). In order to confirm these two phosphorylation sites in Cks1, we constructed the double mutant S2-51A. As expected, the removal of these two serines caused a drastic reduction in ^{32}P incorporation similar to that obtained for the S51A mutant, suggesting again that at this level of analysis, the loss of radioactivity incorporation due to serine 2 removal is not detectable (Figure 1D). The phosphopeptide map of this double mutant, compared to the wild-type's, lacks 3 phosphopeptides, the major one corresponding to the phospho-serine 51 and the doublet corresponding to the phospho-serine 2 (Figure 1E). However, while the three other serines are not phospho-acceptor sites, the physiological significance of the two remaining spots on the S2-51A map needs to be established, as they were reproducibly detected upon overexpression of these proteins. It is possible that these remaining spots belong to a non specific protein that migrates with Myc5-Cks1, and that is slightly phosphorylated.

The alignment of the primary amino-acids sequences of several hsCks1 orthologues revealed that serine 51, which is the major site of phosphorylation of this protein, is conserved in all eukaryotic organisms, from unicellular eukaryotes such as yeasts to more complex pluricellular eukaryotes such as humans (Figure 1F). As far as serine 2 is considered, this phospho-acceptor site is conserved only in metazoans, and is not present in plants or yeasts (Figure 1F).

Cks1 interacts with Cdks in a phospho-independent manner

In order to determine if the loss of these phosphorylation sites alters the interaction of Cks1 with Cdks, especially Cdk1 and Cdk2, we analyzed the co-immunoprecipitation of the endogenous Cdks with the different ectopically expressed wild-type and mutant Myc5-Cks1 proteins. We decided to study the Cks1-Cdk2 interaction, because p27 phosphorylated on threonine 187 forms a heterotrimer with the cyclin E-Cdk2 complex prior to its degradation at the G1/S transition of the cell cycle. Moreover it was also suggested that Cks1, in addition to bind Skp2 and pThr-187 p27, could interact with Cdk2 in order to facilitate the positioning of p27 and optimize its subsequent ubiquitination (Spruck et al., 2001). On the other hand, even if Cdk1 is not involved in p27 degradation, we studied the Cks1-Cdk1 interaction because Cks1 was initially discovered as a Cdk1 partner in yeasts (Hadwiger et al., 1989; Hayles et al., 1986). Furthermore, recently, in *S. cerevisiae*, the Cks1-Cdk1 complex was shown to induce the transcription of certain genes (Morris et al., 2003). Our results indicate that the non-phosphorylatable Cks1 mutants S2A, S51A and S2-51A interact with the kinases Cdk1 and Cdk2 at the same level as the exogenous wild-type protein (Figures 2A and B). As a result, these post-translational modifications on serines 2 and 51 are not implicated, or at least not crucially involved, in the interaction of Cks1 with these two Cdks. Aside from phosphorylation analyzes, during *in vivo* ³²P labeling studies, we noticed that the Cks1 mutant S9A was totally incapable of interacting with Cdk2, unlike the non-phosphorylatable Cks1 mutants (data not shown).

Cks1 interacts with the E3 ligase Skp2 and the Cdk inhibitor p27^{Kip1} in a phospho-dependent manner

In the case of Skp2 and p27, in order to determine if the removal of the phosphorylation sites has an impact on the affinity of Cks1 for its G1/S partners, we used in co-immunoprecipitation experiments the ectopically expressed HA-Skp2 and p27-HA proteins instead of the endogenous forms. Unlike Cks1-Cdks interactions, we observed reproducible variations in the levels of association of the wild-type and non-

phosphorylatable mutants of Cks1 with p27 and Skp2. More precisely, we demonstrated that the S2A mutant of Cks1 interacts with this ubiquitin ligase as well as the wild-type protein, while the association with S51A is slightly diminished. Interestingly, the double non-phosphorylatable S2-51A mutant of Cks1 does not interact with Skp2 or at least below detectable levels by western blotting (Figure 2C). Thus, even if the S2A mutant binds Skp2 at the same levels as the wild-type protein, the two phosphorylation sites on Cks1 appear to be essential for the Cks1-Skp2 interaction.

For the Cdk inhibitor p27^{Kip1}, we showed that the wild-type and S51A mutant forms of Cks1 associate with p27 at maximal levels. However, unlike the Cks1-Skp2 interaction where the phospho-serine 51 seems to be most important in this interaction, it is the removal of phospho-serine 2 that has the greatest impact because the S2A mutant interacts with p27 with a much lower affinity than the two above-mentioned forms of Cks1 (Figure 2D). Just as Skp2, the Cks1 S2-51A mutant-p27 interaction is null, or below detectable levels (Figure 2D). In conclusion, for Skp2 as for p27, it is not one but rather the two phosphorylation sites of Cks1 that favor these crucial interactions for p27 ubiquitination.

In addition to non-phosphorylatable mutants, we tried to develop phospho-mimetic mutants of Cks1 in replacing alanine by glutamic acid or aspartic acid. However, these mutants did not give the expected results in our co-immunoprecipitation experiments. Indeed, the Cks1 mutants S2-51D and S2-51E should have shown interaction signals with p27 and Skp2 at least as important as the wild-type protein, which has not always been the case (data not shown). These results suggest that these substitutions do not effectively mimic the negative charge of the phosphate in positions 2 and 51. Finally, to validate the specificity of our association assays, we confirmed that ectopically expressed p27 T187A mutant protein does not interact with wild-type Myc5-Cks1 (Figure 2E).

The addition of serine 2 is not sufficient to confer Cks2 the potential of substituting Cks1 in its adaptor role within the SCF^{Skp2} ubiquitin ligase

By comparing the primary sequences of the human proteins Cks1 and Cks2, we noticed that serine 2 is not conserved between these two homologous proteins (Figure 1F). More precisely, in hsCks2, the serine 2 is replaced by an alanine. Since these two Cks proteins display significant functional redundancy and sequence homology (Richardson et

al., 1990), we asked whether the mutant protein Cks2 A2S, with the two equivalent Cks1 phosphorylation sites, could substitute Cks1 in its adaptor role. According to our results, the addition of serine 2 does not allow Cks2 to interact with the two Cks1 partners Skp2 and p27. Indeed, in our co-immunoprecipitation experiments, while the positive control wild-type Cks1 protein associates with both Skp2 and p27, neither the wild-type Cks2 protein nor the Cks2 mutant A2S does (Figure 3A and B). As a consequence, the specific adaptor function of hsCks1 in the SCF^{Skp2} complex is not due to an additional phosphorylation site in position 2, compared to hsCks2.

Cks1 phosphorylation has an impact on its subcellular localization

While the data on the subcellular localization of Cks1 are still scarce and controversial, we showed that the ectopically expressed wild-type Myc5-Cks1 protein is localized diffusely in Rat1 cells, with a slightly more intense staining in the nucleus (Figure 4A, first line). In order to confirm our results, we studied the subcellular localization of a differentially tagged Cks1 protein in Rat-1 cells, and demonstrated that the HA-Cks1 protein localizes exactly the same way as the Myc5-Cks1 protein (data not shown). As a result, we assumed that the large My5 tag does not influence Cks1 localization. We could not investigate the localization of the endogenous protein due to the lack of a reliable specific Cks1 antibody.

In this study, we report that the loss of the phosphorylation sites causes changes in the subcellular localization of overexpressed Cks1 protein. Indeed, while the wild-type Cks1 protein is found enriched in the cytoplasmic compartment of only a small proportion (7%) of cells, this exclusive cytoplasmic staining increases to approximately 25% for the non-phosphorylatable Cks1 mutants S2A and S51A, and about 45% for the double mutant S2-51A (Figures 4A and B). These data suggest again that these two post-translational modifications on Cks1 act complementarily in the regulation of Cks1 localization, and that they can be involved in the interaction of Cks1 with a potential cytoplasmic substrate.

According to the paper published by Zhang et al showing that Cks1 is potentially sequestered to the plasma membrane by FRS2 (Fibroblast growth factor receptor substrate 2) (Zhang et al., 2004), we verified if this protein implicated in FGF signaling could

contribute to the cytoplasmic localization of Cks1. However, co-immunoprecipitation studies indicated that the ectopically expressed HA-FRS2-GST protein interacts with comparable affinity with all the Cks1 proteins (Figure 4C).

DISCUSSION

We report here for the first time that the cell cycle adaptor Cks1 is phosphorylated *in vivo* on serines 2 and 51 (Figure 1). Among hsCks1 homologues, Ser51 is highly conserved in all eukaryotic organisms, from yeasts to humans. This level of conservation suggests potentially an important function of its phosphorylation. The other phosphorylated residue on Cks1, Ser2, is only conserved in metazoans. This specific characteristic of that taxon may reveal a more subtle role of this residue, which has evolved in more recent organisms. Very recently, the crystallographic structure of the Skp1-Skp2-Cks1-p27^{Kip1} complex was determined (Hao et al., 2005). As a result, the determination of the precise position of these phosphorylation sites in the structure is essential in order to understand the role of these post-translational modifications in the function of Cks1 within this degradation system. Hao et al revealed that Ser51 is implicated in several hydrogen bonds networks, especially with the phosphate group present on Thr 187 of p27, which is the degradation signal of this CKI. This essential role of Ser51 in the interaction of p27 with the ubiquitin ligase SCF^{Skp2} may explain its great conservation among hsCks1 orthologues, and suggest that phosphorylation of this site could have dramatic consequences on the interaction Cks1-p27. For Ser2, the crystallographic structure gives no clues about its role or precise position within the complex, as they have used a truncated form of Cks1, consisting only of residues 5 to 73, in the study.

While investigating if the loss of these phosphorylation sites could alter the interaction of Cks1 with its different G1/S partners, we demonstrated that the different non-phosphorylatable Cks1 mutants associate with Cdk1 and Cdk2 at the same level as the wild-type protein (Figures 2A and B). This phospho-independence of Cks1-Cdks interactions was expected, because the two phosphorylated serines were not suggested to be part of the amino acids implicated in the association of Cks1 with cyclin-dependent kinases (Sitry et al., 2002). Interestingly, we identified Ser9 as an essential residue for the Cks1-Cdks interactions, because the Cks1 mutant S9A is incapable of interacting with Cdk2 (data not shown). Nevertheless, this site was not shown to be phosphorylated. This loss of

interaction between Cdk2 and Cks1 S9A is probably not due to a major structural change of the protein, because it was shown that this mutant has the potential of ubiquitinating p27 at the same level as the wild-type protein (Sitry et al., 2002). Moreover, the S9A mutant has the same thermodynamic stability as the wild-type protein (Sitry et al., 2002). As a result, we suspect that Ser9 on Cks1 is involved in essential interactions, such as hydrogen bonds, with Cdk2 residues.

More interestingly, we report here that the Cks1-Skp2 and Cks1-p27^{Kip1} interactions are highly dependent on the two Cks1 phosphorylation sites (Figures 2C and D). How can we explain rationally the absolute requirement of these sites for these two interactions? Although these two serines are distant from each other according to the primary amino acids sequence, the crystallographic structure of Skp1-Skp2-Cks1-p27 reveals that these residues are relatively close in 3-D, and could form an interaction surface with the phosphate groups making chemical bounds essential for the Cks1-Skp2 and Cks1-p27 associations. However this concept of binding surface made by the phosphorylated serines 2 and 51 seems more conceivable for the Cks1-p27 interaction. Indeed, for Skp2, this notion is not so obvious because these two residues are not directly involved in the Cks1-Skp2 interaction, which decreases the probability that phosphate groups present on these sites create chemical bounds with Skp2 residues essential for this interaction. Nevertheless, for p27, this hypothesis of binding surface is more realistic, because serines 2 and 51 are in direct contact with the phospho-threonine 187 and nearby amino acids of p27. In our study, the fact that the Cks1 double mutant S2-51A does not bind to Skp2 could be the result of the loss of interaction of this mutant with p27, which is therefore no longer in optimal conditions to associate with high affinity with Skp2. Since Ser51 on Cks1 is crucial for the interaction of pThr-187-p27 with the SCF^{Skp2} complex (Hao et al., 2005), it is expected that the mutation S51A leads to chemical bounds loss. In this case, it would be conceivable that in our co-immunoprecipitation experiments, the loss of interaction of p27 with the Cks1 mutant S2-51A is just due to the loss of hydrogen bounds, and not to the absence of phosphorylation on Ser51. However, this explanation is unlikely for two reasons. First, our results show that the mutant S51A interacts with p27 at the same level as the wild-type protein (Figure 2D). Second, while the residues Lys11, Arg20, Ser51 and Trp54 are implicated in the interaction of Cks1 with the phosphate group on Thr187 of p27, it was

shown that mutations of all these amino acids except Ser51 decrease significantly the potential of Cks1 to support p27 ubiquitination (Sitry et al., 2002). As a consequence, although this mutation can potentially destroy certain chemical bounds formed between Cks1 and p27, the S51A mutant of Cks1 interacts functionally with the SCF^{Skp2} complex in order to degrade p27. Since the double mutant S2-51A of Cks1 does not interact with p27 unlike the S51A mutant (Figure 2D), it is expected that the non-phosphorylatable S2-51A protein can no longer make functional this ubiquitin ligase complex in p27 degradation. Experiments aimed at demonstrating the non-functionality of this double mutant within the SCF^{Skp2} complex are under process. As far as Cks1-Skp2 and Cks1-p27 interactions are considered, these results point towards the crucial role of these two phosphorylation sites on Cks1 rather than chemical bonds disturbance, and lead us to speculate about a phenomenon of synergy or complementarity between these two post-translational modifications.

In this report, we also showed that the addition of Ser2 is not sufficient to confer to Cks2 the potential of substituting for Cks1 in its adaptor role in the SCF^{Skp2} complex (Figures 3A and B). These results are in agreement with the fact that only two residues present on the α 2 helix of Cks1, Ser 41 and Asn 45, are essential for the specific adaptor function of that protein (Hao et al., 2005; Sitry et al., 2002). Thus, unlike our mutant protein Cks2 A2S, Cks2 E41S R45N is capable of binding Skp2, and supporting p27 ubiquitination (Seeliger et al., 2003a).

In our immunofluorescence studies, we found that overexpressed Cks1 protein is located throughout the cell, with a slightly more intense staining in the nucleus (Figure 4A). In terms of Cks1 localization, the disparity between different studies including ours can probably be explained by variations in the cell lines used (Zancai et al., 2005; Zhang et al., 2004). In addition to interfere with Cks1-Skp2 and Cks1-p27 interactions, the loss of the phosphorylation sites causes modifications in the subcellular localization of Cks1 (Figure 4A). Our results suggest a phospho-dependent association of Cks1 with a protein or a protein complex located outside the nucleus. More precisely, unlike Skp2 and p27, the potential cytoplasmic partner of Cks1 seems to have more affinity for the S2-51A mutant compared to the wild-type and the other non-phosphorylatable mutants. While a study of Zhang et al revealed a FRS2-dependent sequestration of Cks1 in the cytoplasm (Zhang et

al., 2004), our data show that this protein cannot explain the cytoplasmic concentration of the non-phosphorylatable Cks1 mutants (Figure 4C). Thus, considering the interaction of Cks1 with Skp2, p27 and FRS2, the only consensus between them is the fact that it is the double mutant of Cks1 that shows at each time the more drastic differences in affinity compared to the wild-type protein. That observation still emphasizes a potential collaboration of these two sites in the formation of a binding surface requiring dual phosphorylation sites.

Cks1 deregulation is observed in human cancers, and its overexpression is associated with a decrease in p27 levels suggesting that this cell cycle regulatory protein could represent a potential anti-cancer target (Inui et al., 2003; Kitajima et al., 2004; Shapira et al., 2004; Shapira et al., 2005; Slotky et al., 2005; Tsai et al., 2005). In agreement with this idea, Huang et al have conducted a high-throughput screen for small inhibitors of the Skp2-Cks1 interface (Huang and Vassilev, 2005). In order to interfere with uncontrolled p27 proteolysis in cancers, we have to better characterize this degradation system, especially the mechanisms of regulation of the different elements of the SCF^{Skp2-Cks1} complex. Our study brings novel information about Cks1 regulation. It will be interesting to monitor the phosphorylation of Ser-2 and Ser-51 of Cks1 in tumors samples and correlate the extent of phosphorylation with disease stage and progression.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Heath for the generous gift of the FRS2 construct. We also thank P. Coulombe for helpful discussion and constructs, and C. Charbonneau for immunofluorescence.

FOOTNOTES

⁽¹⁾The abbreviations used are: Cdk, cyclin-dependent kinase; CKI, Cdk inhibitor; Cks1, Cdk subunit 1; GST, glutathione-S-transferase; HA, hemagglutinin; KPC, Kip1 ubiquitination promoting complex; SCF, Skp1-cullin1-Fbox protein; Skp2, S-phase kinase associated protein 2; FRS2, fibroblast growth factor receptor substrate 2.

REFERENCES

- Arvai, A. S., Bourne, Y., Hickey, M. J., and Tainer, J. A. (1995). Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain. *J Mol Biol* 249, 835-842.
- Bashir, T., Dorrello, N. V., Amador, V., Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* 428, 190-193.
- Bourne, Y., Watson, M. H., Hickey, M. J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S. I., and Tainer, J. A. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* 84, 863-874.
- Burgar, H. R., Burns, H. D., Elsdon, J. L., Lalioti, M. D., and Heath, J. K. (2002). Association of the signaling adaptor FRS2 with fibroblast growth factor receptor 1 (Fgfr1) is mediated by alternative splicing of the juxtamembrane domain. *J Biol Chem* 277, 4018-4023.
- Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 739-751.
- Coulombe, P., Rodier, G., Bonneil, E., Thibault, P., and Meloche, S. (2004). N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* 24, 6140-6150.
- Dessaies, R. J. (1999). SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 435-467.
- Donovan, P. J., and Reed, S. I. (2003). Germline exclusion of Cks1 in the mouse reveals a metaphase I role for Cks proteins in male and female meiosis. *Cell Cycle* 2, 275-276.
- Fleurent, M., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Meloche, S. (1997). Angiotensin II stimulates phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 by a mitogen-activated protein kinase-independent mechanism. *J Biol Chem* 272, 4006-4012.
- Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T. K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., and Hershko, A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 3, 321-324.
- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., *et al.* (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302, 1727-1736.

- Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Mendenhall, M. D., and Reed, S. I. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol Cell Biol* 9, 2034-2041.
- Hao, B., Zheng, N., Schulman, B. A., Wu, G., Miller, J. J., Pagano, M., and Pavletich, N. P. (2005). Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 20, 9-19.
- Harper, J. W. (2001). Protein destruction: adapting roles for Cks proteins. *Curr Biol* 11, R431-435.
- Hayles, J., Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1986). The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol Gen Genet* 202, 291-293.
- Huang, K. S., and Vassilev, L. T. (2005). High-throughput screening for inhibitors of the cks1-skp2 interaction. *Methods Enzymol* 399, 717-728.
- Inui, N., Kitagawa, K., Miwa, S., Hattori, T., Chida, K., Nakamura, H., and Kitagawa, M. (2003). High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 978-984.
- Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2004). Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol* 6, 1229-1235.
- Kitajima, S., Kudo, Y., Ogawa, I., Bashir, T., Kitagawa, M., Miyauchi, M., Pagano, M., and Takata, T. (2004). Role of Cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas: cooperation with Skp2 in promoting p27 degradation. *Am J Pathol* 165, 2147-2155.
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A. C., Draetta, G. F., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13, 1181-1189.
- Morris, M. C., Kaiser, P., Rudyak, S., Baskerville, C., Watson, M. H., and Reed, S. I. (2003). Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* 423, 1009-1013.
- Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., and Loh, D. Y. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-720.
- Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. (2001). Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 853-860.

Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F., and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682-685.

Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.

Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22.

Richardson, H. E., Stueland, C. S., Thomas, J., Russell, P., and Reed, S. I. (1990). Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* 4, 1332-1344.

Rodier, G., Makris, C., Coulombe, P., Scime, A., Nakayama, K., Nakayama, K. I., and Meloche, S. (2005). p107 inhibits G1 to S phase progression by down-regulating expression of the F-box protein Skp2. *J Cell Biol* 168, 55-66.

Rodier, G., Montagnoli, A., Di Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G. F., Pagano, M., and Meloche, S. (2001). p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *Embo J* 20, 6672-6682.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.

Seeliger, M. A., Breward, S. E., Friedler, A., Schon, O., and Itzhaki, L. S. (2003). Cooperative organization in a macromolecular complex. *Nat Struct Biol* 10, 718-724.

Servant, M. J., Coulombe, P., Turgeon, B., and Meloche, S. (2000). Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* 148, 543-556.

Shapira, M., Ben-Izhak, O., Bishara, B., Futerman, B., Minkov, I., Krausz, M. M., Pagano, M., and Herskho, D. D. (2004). Alterations in the expression of the cell cycle regulatory protein cyclin kinase subunit 1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 100, 1615-1621.

Shapira, M., Ben-Izhak, O., Linn, S., Futerman, B., Minkov, I., and Herskho, D. D. (2005). The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* 103, 1336-1346.

Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

- Sitry, D., Seeliger, M. A., Ko, T. K., Ganoth, D., Breward, S. E., Itzhaki, L. S., Pagano, M., and Hershko, A. (2002). Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation. *J Biol Chem* 277, 42233-42240.
- Slingerland, J., and Pagano, M. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 183, 10-17.
- Slotky, M., Shapira, M., Ben-Izhak, O., Linn, S., Futerman, B., Tsalic, M., and Hershko, D. D. (2005). The expression of the ubiquitin ligase subunit Cks1 in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, R737-744.
- Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A. P., Ryan, A., Krek, T. W., and Reed, S. I. (2001). A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* 7, 639-650.
- Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.
- Tsai, Y. S., Chang, H. C., Chuang, L. Y., and Hung, W. C. (2005). RNA silencing of Cks1 induced G2/M arrest and apoptosis in human lung cancer cells. *IUBMB Life* 57, 583-589.
- Vidal, A., and Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247, 1-15.
- Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. (1997). Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* 16, 5334-5344.
- Wang, I. C., Chen, Y. J., Hughes, D., Petrovic, V., Major, M. L., Park, H. J., Tan, Y., Ackerson, T., and Costa, R. H. (2005). Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 25, 10875-10894.
- Zancai, P., Dal Col, J., Piccinin, S., Guidoboni, M., Cariati, R., Rizzo, S., Boiocchi, M., Maestro, R., and Dolcetti, R. (2005). Retinoic acid stabilizes p27Kip1 in EBV-immortalized lymphoblastoid B cell lines through enhanced proteasome-dependent degradation of the p45Skp2 and Cks1 proteins. *Oncogene* 24, 2483-2494.
- Zhang, Y., Lin, Y., Bowles, C., and Wang, F. (2004). Direct cell cycle regulation by the fibroblast growth factor receptor (FGFR) kinase through phosphorylation-dependent release of Cks1 from FGFR substrate 2. *J Biol Chem* 279, 55348-55354.

LEGENDS TO FIGURES

Fig.1. Cks1 is phosphorylated on Ser 2 and 51 *in vivo*. (A) Exponentially growing NIH3T3 fibroblasts were transfected with either the vector alone (negative control) or Myc6-Cks1 expression vector, and then labeled with 0.5 mCi/ml [³²P] phosphoric acid for 5h. The cells were lysed and the ectopically expressed Myc6-Cks1 protein was immunoprecipitated with anti-Myc antibody. The precipitated proteins were resolved by SDS-gel electrophoresis, transferred to PVDF membrane, and analyzed by autoradiography. (B) The ³²P-labeled Myc6-Cks1 protein band was excised from the membrane and digested with trypsin. The resulting phosphopeptides were separated by thin layer electrophoresis followed by ascending chromatography. The arrow denotes the position of sample application. (C) The different resolved phosphopeptides were individually removed from cellulose and digested with HCl. The resulting phospho-amino acids were separated by thin layer electrophoresis. (D) Same thing as in (A) except that HEK 293 cells were used instead of NIH3T3 fibroblasts. The cells were transfected with the vector alone, the wild-type Myc5-Cks1 construct, and the different non-phosphorylatable Myc5-Cks1 mutants S2A, S51A and S2-51A. The abundance of the different ectopically expressed Myc5-Cks1 proteins was monitored by anti-Myc immunoblotting (bottom). (E) Same thing as in (B) for the different ³²P-labeled Myc5-Cks1 protein bands. The red arrows indicate the lost phosphopeptides due to Ser to Ala mutations, whereas the black ones denote the position of sample application. (F) Partial alignment of eukaryotic hsCks1 homologues emphasizing the conservation of the two phosphorylated serines highlighted in red (made using ClustalW software).

Fig.2. The loss of phosphorylation sites alters the interaction of Cks1 with the E3 ligase Skp2 and the Cdk inhibitor p27^{Kip1}. (A) Exponentially growing HEK293 cells were transiently transfected with expression vectors encoding wild-type (WT) and non-phosphorylatable (2A, 51A, AA) Myc5-Cks1 proteins. The resulting lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-Myc antibody, and the

levels of immunoprecipitation of these Myc5-Cks1 proteins, and co-immunoprecipitation of endogenous Cdk2 were revealed by immunoblotting with anti-Myc and anti-Cdk2 antibodies respectively (2 bottom panels). The abundance of the different endogenous and ectopically expressed proteins was monitored by immunoblotting with anti-Myc and anti-Cdk2 antibodies (2 upper panels). (B) Same thing as in (A) for the endogenous protein Cdk1. (C) Exponentially growing HEK 293 cells were transiently co-transfected with either the vector alone, Myc5-Cks1 WT, 2A, 51A or AA, and the HA-Skp2 construct. The resulting lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-Myc antibody, and the levels of immunoprecipitation of these Myc5-Cks1 proteins, and co-immunoprecipitation of exogenous HA-Skp2 were revealed by immunoblotting with anti-Myc and anti-HA antibodies respectively (2 bottom panels). The abundance of the different ectopically expressed proteins was monitored by immunoblotting with anti-Myc and anti-HA antibodies (2 upper panels). (D) Same thing as in (C) for the exogenous protein p27-HA. (E) Same thing as in (C) except that exponentially growing HEK 293 cells were transiently co-transfected with wild-type Myc5-Cks1 protein and either the exogenous protein p27-HA as a positive control, or the mutant protein p27-HA-T187A.

Fig.3. Cks2 A2S cannot functionally substitute for Cks1 and bind Skp2 and p27^{Kip1}.

(A) Exponentially growing HEK 293 cells were transiently co-transfected with either the vector alone, Myc5-Cks1 WT, Myc5-Cks2 WT, or Myc5-Cks2 A2S, and the HA-Skp2 construct. The resulting lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-Myc antibody, and the levels of immunoprecipitation of these Myc5-tagged proteins, and co-immunoprecipitation of exogenous HA-Skp2 were revealed by immunoblotting with anti-Myc and anti-HA antibodies respectively (2 bottom panels). The abundance of the different ectopically expressed proteins was monitored by immunoblotting with anti-Myc and anti-HA antibodies (2 upper panels). (B) Same thing as in (A) for the exogenous protein p27-HA.

Fig.4. Phosphorylation of Cks1 alters its subcellular localization. (A) Rat-1 cells were transfected with Myc5-tagged Cks1 wild-type or non-phosphorylatable mutants S2A, S51A, and S2-51A. The subcellular localization of these ectopically expressed proteins was determined by fluorescence microscopy after staining with anti-Myc antibody. The cell nuclei were counterstained with DAPI, and merged with the immunofluorescent staining. (B) Quantitative evaluation of the cellular localization of Cks1 wild-type and non-phosphorylatable mutants. At least 150 cells were scored for each coverslip. The results are expressed as the percentage of cells showing either cytoplasmic or nucleo-cytoplasmic staining. The graph represents the mean \pm SEM of three separate experiments. (C) Exponentially growing HEK 293 cells were transiently co-transfected with either the vector alone, Myc5-Cks1 WT, 2A, 51A or AA, and the HA-FRS2-GST construct. The resulting lysates were subjected to immunoprecipitation with anti-Myc antibody, and the levels of immunoprecipitation of these Myc5-Cks1 proteins, and co-immunoprecipitation of exogenous HA-FRS2-GST were revealed by immunoblotting with anti-Myc and anti-FRS2 antibodies respectively (2 bottom panels). The abundance of the different ectopically expressed proteins was monitored by immunoblotting with anti-Myc and anti-FRS2 antibodies (2 upper panels).

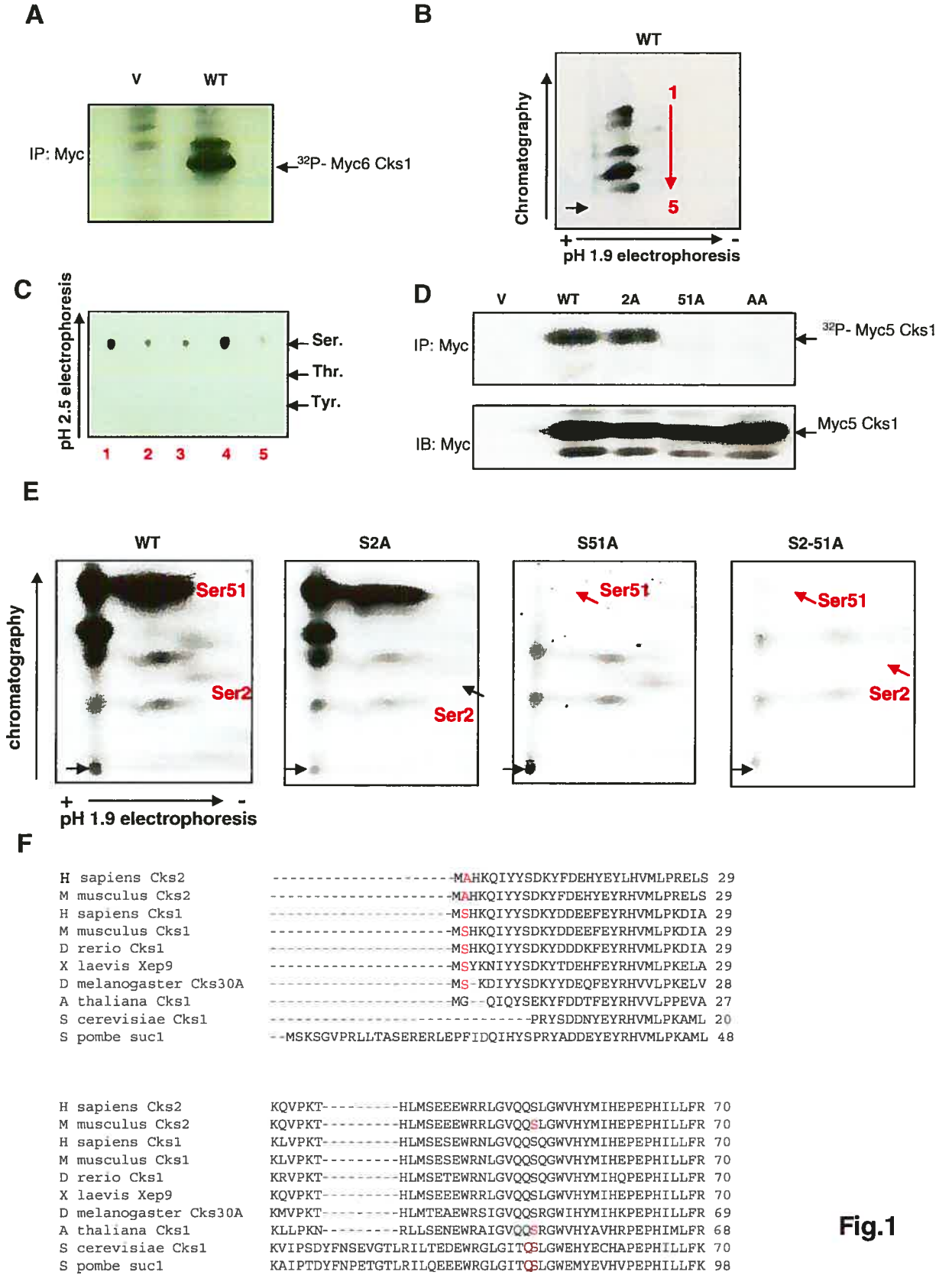


Fig.1

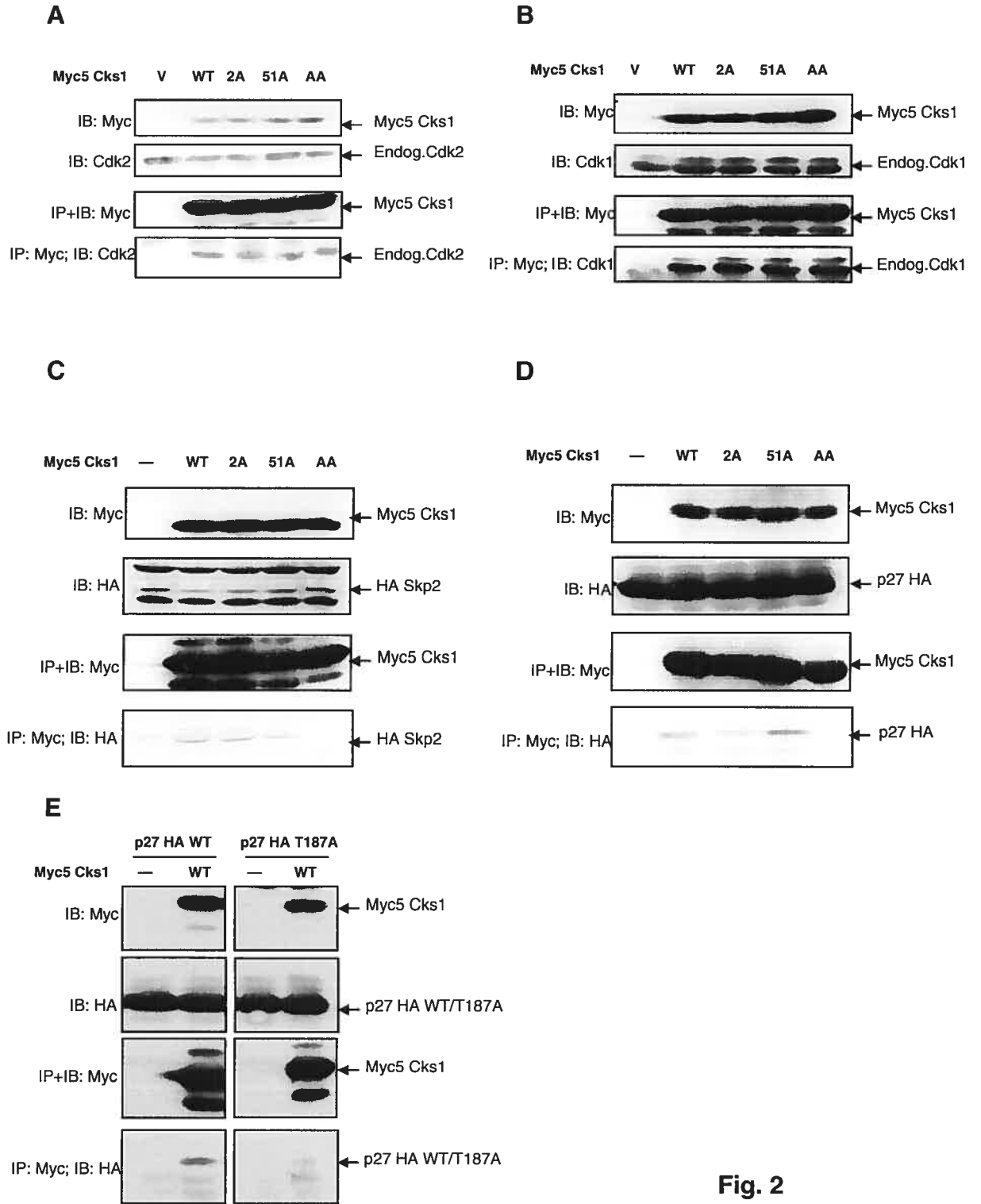


Fig. 2

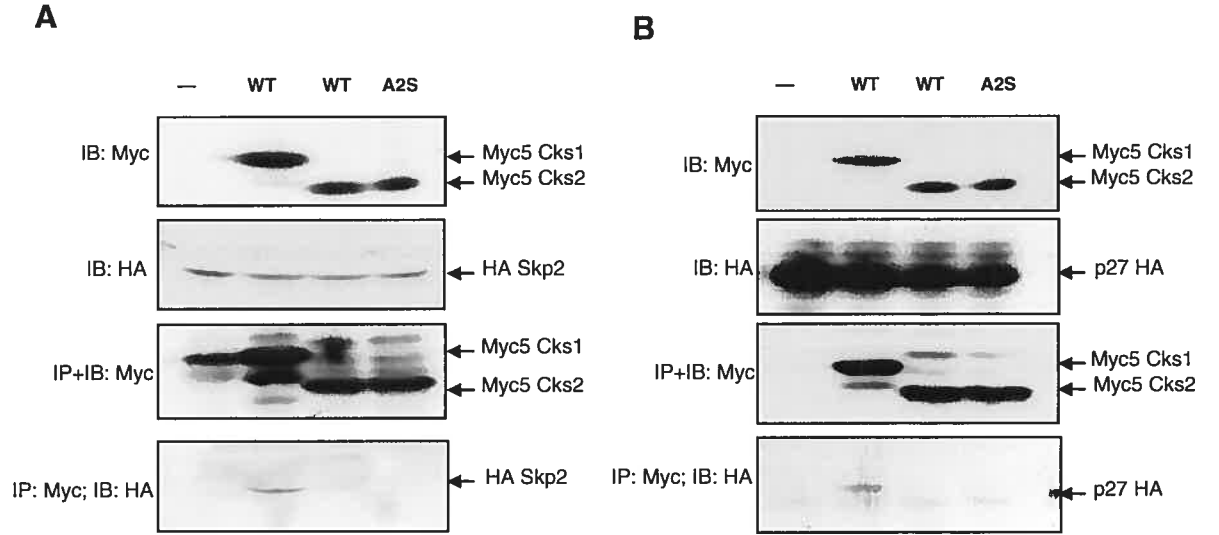


Fig. 3

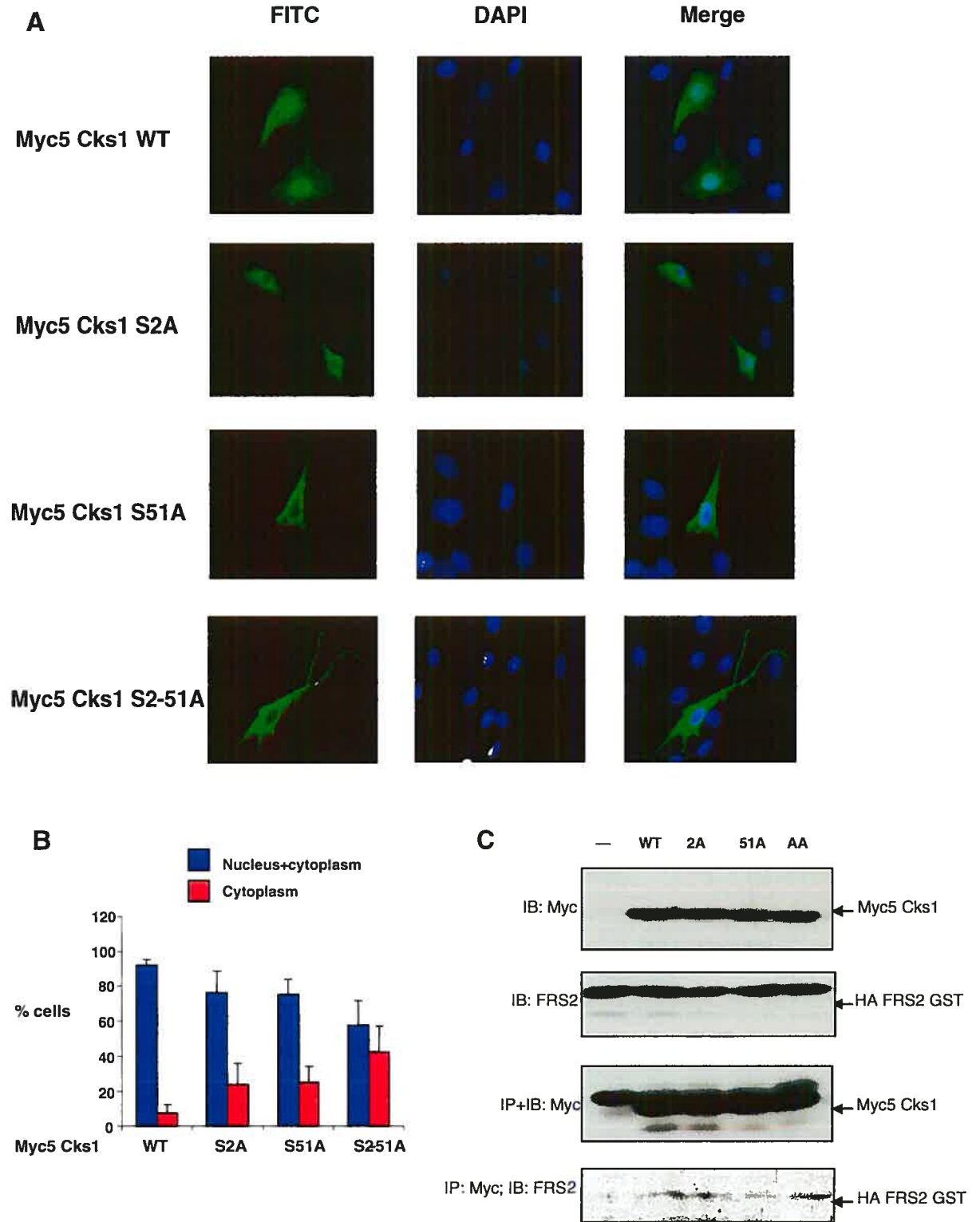


Fig. 4

4. DISCUSSION

4.1 Cks1 est phosphorylé *in vivo* sur les sérines 2 et 51

Pour démontrer par marquage métabolique au ^{32}P que Cks1 était phosphorylé *in vivo* uniquement sur des sérines, nous avons utilisé une construction Myc6-Cks1. Ensuite, pour déterminer quelles sérines étaient phosphorylées, nous avons construit des mutants S/A de Cks1 pour chacune des 5 sérines présentes dans la séquence primaire de cette protéine, ce qui a donné les mutants S2A, S9A, S39A, S41A, et finalement S51A. Cependant, nous avons rencontré un problème en ce qui concerne le mutant pour la sérine 2. En effet, dû au site de restriction EcoRI placé après le tag N-terminal Myc6 des différentes constructions de Cks1, une sérine est réintroduite en amont de la sérine 2 mutée en alanine. Pour remédier à ce problème et supprimer cette sérine artificielle, nous avons décidé de modifier ce tag N-terminal Myc6 par un tag Myc5 en enlevant le sixième Myc. Dans ces constructions Myc5, l'insert Cks1 n'est plus cloné EcoRI-XbaI comme dans les constructions Myc6, mais plutôt NcoI-XbaI, ce qui supprime la sérine créée par le site de restriction EcoRI. D'une façon surprenante, nous avons observé que les constructions Myc5-Cks1 s'expriment à des niveaux beaucoup plus bas que les constructions précédentes Myc6-Cks1 dans la lignée cellulaire NIH3T3 (Fig.28). Ainsi, afin d'obtenir des cartes phosphopeptidiques avec des signaux radioactifs satisfaisants, nous avons été obligé de changer de lignée cellulaire pour réaliser nos marquages métaboliques au ^{32}P . Puisque les niveaux d'expression des constructions Myc5 et Myc6 de Cks1 étaient similaires dans la lignée cellulaire HEK293, à la différence de NIH3T3, nous avons pris cette lignée comme référence pour nos manipulations suivantes (Fig.28). Pour s'assurer de la validité expérimentale de ce changement de construction et de lignée cellulaire, nous avons démontré que la carte phosphopeptidique en 2D de la construction Myc6-Cks1 sauvage exprimée dans des cellules NIH3T3 présente des similitudes avec celle de Myc5-Cks1 dans des cellules HEK293, en particulier pour la présence de 5 phosphopeptides majeurs.

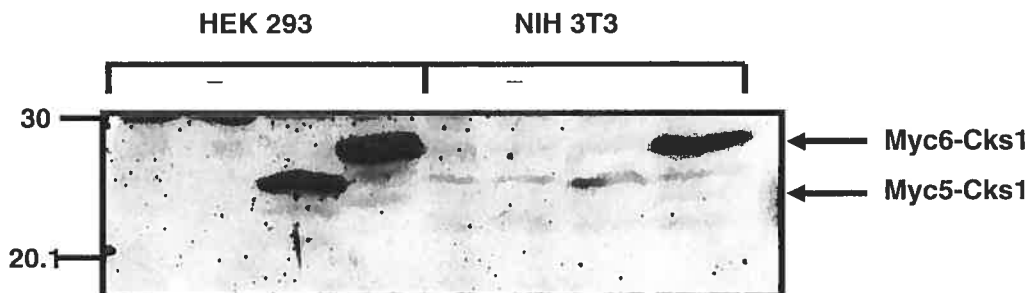


Figure 28 : Immunobuvardage montrant que la construction Myc5-Cks1 WT s'exprime à des niveaux plus bas que Myc6-Cks1 WT dans des NIH3T3, et à des niveaux comparables dans des HEK293. Anticorps utilisé : anti-Cks1 (Sigma, lapin 472-3). Quantité de protéines utilisée : 50 microgrammes/puit.

Cette différence d'expression entre les constructions Myc6-Cks1 et Myc5-Cks1 dans les cellules NIH3T3 peut potentiellement suggérer une variation dans la stabilité de ces différentes protéines taggées Cks1, et plus précisément, le tag en N-terminal pourrait, en fonction de sa taille, plus ou moins stabiliser la protéine Cks1 en interférant avec son ubiquitination en N-terminale. Cependant, tout ceci n'est que spéculation, et mérite d'être testé expérimentalement. Le fait que cette variation d'expression n'est pas observée dans les cellules HEK293 reste obscur. La présence ou non de cette variation d'expression pourrait dépendre de la nature de la lignée cellulaire utilisée, en d'autres termes, transformée ou non.

Ayant réglé ces problèmes d'expression, par l'intermédiaire de marquages métaboliques au ^{32}P , nous avons pu démontrer pour la première fois que l'adaptateur du cycle cellulaire Cks1 est phosphorylé *in vivo* sur les sérines 2 et 51. Le fait que la carte phosphopeptidique de Myc5-Cks1 sauvage présente 5 signaux majeurs alors qu'il semble qu'il existe uniquement 2 sites phosphorylés sur cette protéine peut être expliqué par une variation dans les niveaux d'oxydation d'un même phosphopeptide, en particulier au niveau des acides aminés méthionine. En effet, dû à ces variations d'oxydation qui peuvent être causées par exemple par un temps de manipulation variable, un phosphopeptide donné peut migrer à plusieurs endroits sur une membrane de cellulose, ceci étant caractérisé classiquement par la présence de doublets ou triplets plus ou moins éloignés. Ceci est le cas du phosphopeptide contenant la sérine 2 phosphorylée. En effet, en observant la carte 2D du mutant S2A, nous pouvons observer que ce n'est pas un seul signal radioactif qui disparaît, mais plutôt un doublet de signaux. Afin de confirmer les sites de phosphorylation identifiés, nous avons construit le double mutant non-phosphorylable S2-51A de Cks1. Cependant, en

observant sa carte 2D, on voit qu'il y reste des signaux radioactifs, ceci suggérant que les 5 signaux observés sur la carte de Myc5-Cks1 sauvage ne sont pas tous dus à des doublets ou triplets formés par des variations d'oxydations des 2 phosphopeptides contenant les sérines 2 et 51 phosphorylées. Ainsi, une hypothèse pouvant expliquer la présence de signaux additionnels sur la carte 2D du double mutant S2-51A est la phosphorylation de certains acides aminés présents sur le tag Myc5. Néanmoins, cette possibilité est très peu probable car des expériences similaires avec d'autres protéines taggées de la même manière ont été faites dans le laboratoire, et l'épitope Myc5 n'a jamais montré de phosphorylation. Une meilleure hypothèse serait qu'une protéine contaminante phosphorylée migre au même niveau que Myc5-Cks1 sur le gel de polyacrylamide et que, par conséquent, lors de l'excision du morceau de membrane correspondant à Myc5-Cks1, on récupère également ce contaminant qui serait potentiellement à l'origine des signaux additionnels.

D'un autre côté, nous aimerions confirmer la phosphorylation de ces sites sur la protéine endogène, mais il nous manque des outils robustes. En effet, il nous est impossible de faire ceci par marquage métabolique au ^{32}P car nous ne possédons pas d'anticorps • Cks1 assez efficaces pour immunoprécipiter Cks1 endogène dans une quantité suffisante pour réaliser des cartes phosphopeptidiques. Nous sommes actuellement en train de travailler sur une alternative au marquage métabolique en misant sur la technologie de spectrométrie de masse. Nous voudrions immunoprécipiter Cks1 endogène indirectement par l'intermédiaire d'un « pull-down » avec la construction GST-CDK1, cette dernière étant décrite comme une protéine de très haute affinité pour Cks1. Ensuite, après une coloration à l'argent du gel de protéines, nous soumettrons la bande correspondante à Cks1 pour analyse en spectrométrie de masse pour la confirmation des sites de phosphorylation sur Cks1 endogène. De plus, puisque toutes nos expériences de marquage métabolique ont été faites dans des conditions de croissance exponentielle des cellules, afin de raffiner notre caractérisation, il serait très intéressant de déterminer la cinétique de phosphorylation de ces 2 sites au cours du cycle cellulaire. Ces informations cinétiques pourraient en plus nous donner de bons indices quant à la fonction physiologique de ces modifications post-traductionnelles. Pour les mêmes raisons décrites auparavant, autrement dit la non-disponibilité d'anticorps robustes, l'étude de ces cinétiques de phosphorylation par marquage n'est pas possible sur la protéine endogène. La solution idéale serait de disposer

de deux anticorps phospho-spécifiques pour les sérines 2 et 51 phosphorylées. Ces anticorps, en plus de permettre la détermination des cinétiques de phosphorylation par immunobuvardage, pourraient nous aider à confirmer les kinases et les phosphatases régulant la phosphorylation et la déphosphorylation de cette protéine. Pour identifier les protéines régulant le niveau de phosphorylation de Cks1, une approche de purification par affinité en tandem (TAP) ou un criblage fonctionnel à l'aide d'une librairie de shRNA sont envisagés et en cours dans le laboratoire.

En ce qui concerne la conservation au cours de l'évolution de ces 2 sérines phosphorylées dans les différentes protéines orthologues de hCks1, la sérine 51, qui constitue le site majeur de phosphorylation de hCks1, est conservée dans tous les organismes eucaryotes analysés. En effet, la sérine 51 est conservée des eucaryotes unicellulaires tels que les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae* jusqu'aux eucaryotes pluricellulaires complexes tels que l'humain. La conservation marquée de ce résidu au cours de l'évolution suggère un rôle majeur de ce résidu, et potentiellement de sa phosphorylation. D'autre part, la sérine 2 est conservée uniquement chez les métazoaires, tels que la drosophile, la grenouille, le poisson zèbre, la souris ou encore l'humain, à la différence de la plante *A. thaliana* ou des levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*. Cette caractéristique spécifique aux métazoaires suggère une fonction plus subtile de ce résidu, cette dernière ayant évolué dans des organismes plus récents en termes d'évolution.

Très récemment, en Octobre 2005, la structure cristallographique du complexe humain Skp1-Skp2-Cks1-p27^{Kip1} a été déterminée avec une précision jamais atteinte de 2.3 Å (Hao et al., 2005). Par conséquent, la détermination de la position des différents sites de phosphorylation identifiés dans cette structure cristallographique se révèle essentielle pour essayer de mieux comprendre le rôle de ces modifications post-traductionnelles dans la fonction de Cks1 au sein de ce complexe de dégradation. Ainsi, il a été montré que la sérine 51 de Cks1 est impliquée dans de nombreux réseaux de liaisons hydrogène, en particulier avec le groupement phosphate présent sur la thréonine 187 de p27, ce dernier étant le signal de dégradation de ce CKI (Hao et al., 2005). Ce rôle essentiel de la sérine 51 dans l'interaction de p27 avec le complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2} explique potentiellement sa grande conservation dans les protéines orthologues de hCks1, et suggère que la phosphorylation de ce site pourrait avoir des conséquences dramatiques sur l'interaction de

Cks1 avec p27. En effet, basées sur le travail du groupe de Pavletich, des études de modélisation faites récemment dans notre laboratoire suggèrent qu'une phosphorylation de la sérine 51 pourrait bloquer l'accès au site de liaison pour les anions de Cks1, ce qui empêcherait, par répulsion électrostatique, le groupement phosphate présent sur la Thr 187 de p27 de se lier à Cks1. Dans ce cas, la phosphorylation sur la sérine 51 inhiberait la liaison de p27 phosphorylé sur la Thr 187 au complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2-Cks1} (voir annexes). En ce qui concerne la sérine 2, la structure déterminée par le groupe de Pavletich ne donne aucune indication sur son rôle et sa position précise dans le complexe car les auteurs ont utilisé une forme tronquée de hCks1 pour des raisons de solubilité. Cependant, en observant une vue agrandie de l'interaction du phosphopeptide de p27 avec l'interface Skp2-Cks1, on peut prédire que la sérine 2 est localisée dans une région proche du phosphopeptide (Fig.17). Ainsi, la phosphorylation de ce résidu pourrait permettre la création d'autres liaisons importantes pour l'interaction de p27 avec le complexe SCF^{Skp2}. En conclusion, même si la phosphorylation sur la sérine 51 de Cks1 pourrait avoir individuellement un impact négatif sur l'interaction de p27 avec SCF^{Skp2}, une double phosphorylation des résidus 2 et 51 pourrait créer un important réseau de liaisons favorable à cette interaction, comme le laisse penser les résultats de co-immunoprécipitation présentés dans la section 4.3 de ce mémoire.

4.2 Les interactions Cks1-CDK sont phospho-indépendantes.

Pour déterminer si la perte des sites de phosphorylation modifie l'interaction de Cks1 avec les CDKs, notamment CDK1 et CDK2, nous avons effectué des co-immunoprécipitations non pas avec des constructions surexprimées des kinases, mais plutôt avec les formes endogènes de ces protéines. Notre choix d'utiliser les formes endogènes s'explique par le fait que l'affinité de Cks1 pour ces CDKs est bien plus importante que pour ses autres partenaires à la transition G1/S, autrement dit Skp2 et p27. Nous avons décidé d'étudier l'interaction entre Cks1 et CDK2 car p27 phosphorylé sur la thréonine 187 est présent sous forme trimérique avec le complexe cycline E-CDK2 à la transition G1/S en vue de sa dégradation. De plus, il a été postulé que Cks1, en plus de lier Skp2 et p27, pourrait lier CDK2 afin d'optimiser le positionnement de p27 et par conséquent son ubiquitination subséquente. En ce qui concerne l'interaction Cks1-CDK1, même si ce complexe ne fait pas partie du système de dégradation de p27, nous l'avons étudié car Cks1 a été initialement décrit comme une protéine interagissant avec CDK1 dans les levures. De plus, récemment, chez *S. cerevisiae*, il a été montré que ces deux protéines s'associent pour induire l'expression de certains gènes (Morris et al., 2003).

Nos résultats indiquent que les formes non-phosphorylables de Cks1, Cks1 S2A, S51A et S2-51A, interagissent avec CDK1 et CDK2 de la même façon que la forme sauvage surexprimée de la protéine (voir figures 2A et 2B de l'article). Par conséquent, dans le modèle du groupe de Reed où le complexe Cks1-CDK1 favorise l'expression d'environ 25% des gènes de la levure *S. cerevisiae*, nos formes mutantes non-phosphorylables de Cks1 ne devraient pas perdre leur activité transcriptionnelle, comparé à la forme sauvage exogène. Cependant, la perte de ces sites de phosphorylation sur Cks1 pourrait tout de même altérer l'activité de ce système dans le cas où d'autres partenaires seraient impliqués dans le bon fonctionnement de ce complexe transcriptionnel, et que leurs interactions avec l'adaptateur Cks1 soient phospho-dépendantes. Cette dernière hypothèse nécessite la découverte potentielle de partenaires pour être vérifiée. Cette phospho-indépendance des interactions Cks1-CDKs était à prévoir puisque les 2 sérines phosphorylées ne font pas partie des acides aminés qui avaient été suggérés pour participer dans l'association de Cks1 avec ces kinases dépendantes des cyclines (Sitry et al., 2002).

Lors de nos expériences de marquage métabolique, nous avons identifié un mutant simple de hCks1, Cks1 S9A, qui ne lie pas la kinase CDK2, contrairement à tous les mutants non-phosphorylables de Cks1 (Fig.29). La découverte de ce mutant est d'autant plus intéressante que la sérine 9 n'a jamais été répertoriée dans la liste des acides aminés impliqués dans l'interaction de Cks1 avec les CDKs (Sitry et al., 2002). Deux hypothèses peuvent potentiellement expliquer cette perte d'interaction entre CDK2 et Cks1 S9A. Tout d'abord, cet acide aminé peut être important en terme de liaisons chimiques spécifiques à cette interaction. Dans ce cas, ce mutant de Cks1 pourrait jouer le rôle d'un dominant négatif par rapport à la protéine endogène en ce qui concerne les interactions Cks1-CDKs. D'un autre côté, d'une façon moins spécifique et par conséquent moins attrayante, cette mutation pourrait bloquer cette interaction en dénaturant complètement la protéine. Cependant, cette dernière hypothèse est peu probable car il a été montré qu'un mutant S9A de Cks1 est capable d'ubiquitiner p27 au même niveau que la protéine sauvage, ce qui ne serait pas envisageable dans le cas d'une protéine mutante dénaturée (Sitry et al., 2002).

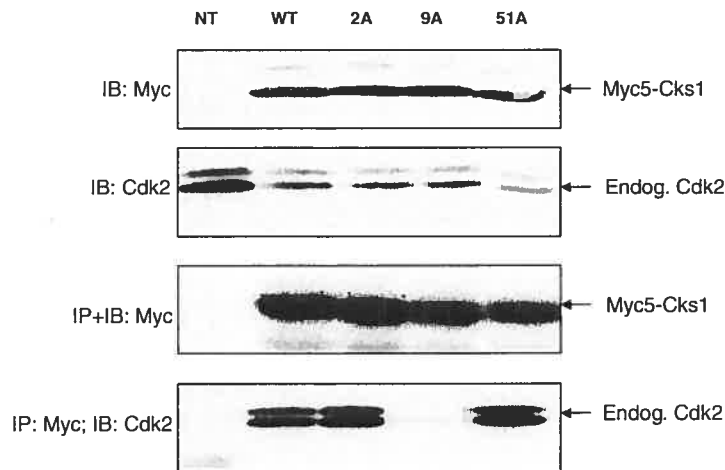


Figure 29 : **Le mutant S9A, à la différence des mutants non-phosphorylables de Cks1, ne lie pas la kinase CDK2.** Des cellules HEK293 ont été transfectées avec différentes constructions de hCks1 et les lysats obtenus ont été immunoprécipités avec un anticorps anti-Myc. Les niveaux d'immunoprécipitation de Myc5-Cks1 et de co-immunoprécipitation de Cdk2 ont été révélés par immunobuvardage avec des Ac anti-Myc et anti-Cdk2.

4.3 Les interactions Cks1-Skp2 et Cks1-p27^{Kip1} sont phospho-dépendantes.

Ici, du fait d'une affinité moins importante de Cks1 pour Skp2 et p27, lors des co-immunoprécipitations, nous n'avons pas utilisé les formes endogènes de ces protéines comme pour les CDKs, mais plutôt des formes surexprimées étiquetées avec HA. En ce qui concerne la protéine « F-Box » Skp2, nos résultats indiquent que la protéine Cks1 sauvage exogène interagit de la même façon que le mutant S2A avec cette protéine. De plus, le mutant S51A de Cks1 semble avoir légèrement moins d'affinité pour Skp2 que les 2 autres formes de Cks1 mentionnées ci-dessus. Finalement, d'une façon très intéressante, le double mutant non-phosphorylable S2-51A ne paraît pas lier son partenaire Skp2, ou alors à des niveaux insuffisants pour être détectés par immunobuvardage (voir figure 2C de l'article). Par conséquent, bien que le mutant S2A de Cks1 lie Skp2 avec la même intensité que la protéine sauvage, les 2 sites de phosphorylation sur Cks1 semblent être importants dans l'interaction de l'adaptateur Cks1 avec Skp2. Analysant ces résultats, il est tentant de parler d'un phénomène de synergie entre ces 2 modifications post-traductionnelles car la perte simultanée de ces 2 sites dans le mutant S2-51A diminue drastiquement l'interaction entre ces deux protéines, tandis que l'absence d'un seul site sur Cks1 n'a que des effets mineurs, notamment pour le mutant S51A.

Aussi longtemps que p27 est considéré, nous avons observé que la protéine sauvage de Cks1 et sa forme mutante S51A lient à des niveaux maximaux cet inhibiteur de CDKs. D'un autre côté, dans l'association Cks1-p27, à la différence de l'interaction Cks1-Skp2 où la phosphorylation sur la sérine 51 paraît la plus importante, il semble que cette fois-ci la phosphorylation sur la sérine 2 a le plus d'impact puisque le mutant S2A interagit avec p27 à des niveaux beaucoup plus faibles que la protéine sauvage, ou encore le mutant S51A. D'une façon similaire à Skp2, le double mutant non-phosphorylable S2-51A de Cks1 ne s'associe pas à des niveaux détectables avec p27 (voir figure 2D de l'article). Pour p27 comme pour Skp2, ce n'est pas un mais plutôt les deux sites de phosphorylation de Cks1 qui favorisent ces interactions. Comment pouvons-nous expliquer d'une façon rationnelle la nécessité absolue de ces deux sites de phosphorylation sur Cks1 pour optimiser ces 2 interactions. En fait, bien que ces 2 sérines phosphorylées sur Cks1 soient très éloignées l'une de l'autre au niveau de la séquence primaire d'acides aminés, la structure

cristallographique du complexe Skp1-Skp2-Cks1-p27 révèle que ces deux résidus sont relativement proches en 3D, et pourraient ainsi former une surface de liaison avec les 2 groupements phosphate créant des liaisons chimiques essentielles aux interactions Cks1-Skp2 et Cks1-p27. Cependant, d'après la structure de ce complexe quaternaire, ce concept de surface de liaison faite par les sérines 2 et 51 phosphorylées semble réaliste uniquement pour l'interaction de Cks1 avec p27, et dans le cas du modèle, le phosphopeptide de p27. En effet, les sérines 2 et 51 de Cks1 ne sont aucunement impliquées dans l'interface d'interaction Cks1-Skp2, ce qui diminue les probabilités que des phosphorylations sur ces deux sites crée des liaisons chimiques avec des résidus de Skp2, ces dernières étant essentielles à cette interaction. Par contre, en ce qui concerne l'interaction de Cks1 avec le phosphopeptide de p27, cette notion de surface de liaison créée par ces 2 modifications post-traductionnelles sur les sérines 2 et 51 est totalement possible car ces 2 résidus sont en contact direct avec les résidus de p27, notamment la phospho-thréonine 187 et les acides aminés avoisinants (Fig.17). Ainsi, le fait que le double mutant non-phosphorylable de Cks1 ne lie pas Skp2 alors que les résidus 2 et 51 ne sont pas impliqués dans cette interaction pourrait être le résultat d'une perte d'interaction de ce mutant avec p27, ce dernier n'étant plus alors dans des conditions optimales pour s'associer avec son partenaire Skp2.

D'après le papier du groupe de Pavletich, la sérine 51 de Cks1 dans un état non-phosphorylé est essentielle à l'interaction de p27 avec le complexe SCF^{Skp2} car sa chaîne centrale et latérale forment de nombreuses liaisons hydrogène avec p27, et notamment avec le groupe phosphate présent sur la thréonine 187 (Hao et al., 2005). Ainsi, il est fort probable que la mutation S51A cause la perte de ces liaisons chimiques. Dans ce cas, dans nos expériences de co-immunoprécipitation, la perte d'interaction des différents mutants non-phosphorylables de Cks1, notamment le double mutant S2-51A, avec p27 pourrait être due juste à la perte de liaisons chimiques, et non à l'absence de phosphorylation sur la sérine 2 mais surtout 51. Cependant, cette hypothèse est improbable pour deux raisons. Tout d'abord, nos résultats montrent que le mutant S51A de Cks1 interagit avec p27 de la même façon que la protéine sauvage (voir figure 2D de l'article). D'un autre côté, alors que les résidus Lys11, Arg20, Ser51 et Trp 54 sont impliqués dans l'interaction de Cks1 avec le groupement phosphate sur la thréonine 187 de p27, il a été montré que des mutations de

tous ces acides aminés excepté la sérine 51 causent une diminution significative du potentiel de Cks1 à supporter l'ubiquitination de p27 (Sitry et al., 2002). Autrement dit, à la différence de tous les autres mutants, l'ubiquitination de p27 causée par le mutant S51A de Cks1 est semblable à celle obtenue avec la protéine sauvage. Par conséquent, malgré cette mutation qui pourrait potentiellement détruire certaines liaisons chimiques faites entre Cks1 et p27, le mutant S51A interagit de manière fonctionnelle avec le complexe SCF^{Skp2} pour ubiquitiner p27. Nos résultats de co-immunoprécipitation sont donc en accord avec les essais d'ubiquitination publiés par le groupe de Hershko (Sitry et al., 2002).

En plus de construire des mutants non-phosphorylables de Cks1, nous avons également tenté de développer des mutants phosphomimétiques de cette protéine : S2D, S2E, S51D, S51E, S2-51D et S2-51E. Nous avons muté les sérines 2 et 51 en acide glutamique (E) ou en acide aspartique (D) car ces deux acides aminés sont décrits dans la littérature comme les meilleurs équivalents d'une sérine phosphorylée. Cependant, ces mutants n'ont pas donné les résultats escomptés lors des expériences de co-immunoprécipitation. En effet, pour Skp2 comme pour p27, les doubles mutants phosphomimétiques de Cks1, Cks1 S2-51D et S2-51E, auraient dû théoriquement montrer un signal d'interaction au moins aussi important que la protéine sauvage, ce qui n'a pas toujours été le cas. Ainsi, ces mutants, comme il arrive très souvent, ne semblent pas mimer parfaitement la phosphorylation de Cks1.

Finalement, afin de confirmer la validité de nos expériences de co-immunoprécipitation, nous avons démontré que la forme mutante de p27, p27 T187A, ne lie pas Myc5-Cks1, ce résultat étant attendu puisque ce mutant de p27 ne peut pas être phosphorylé sur la thréonine 187, et par conséquent ne peut pas être reconnu par le complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2-Cks1} en vue de sa dégradation (Fig.2E de l'article).

4.4 L'ajout de la sérine 2 n'est pas suffisant pour conférer à Cks2 le potentiel de substituer Cks1 dans son rôle d'adaptateur dans le complexe SCF^{Skp2}.

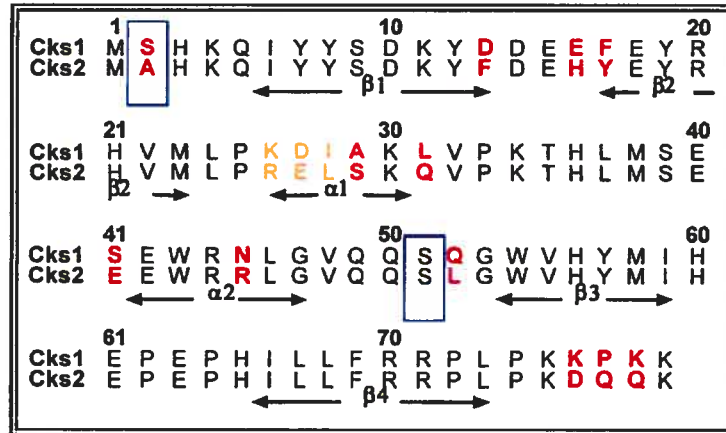


Figure 30 : Comparaison des séquences primaires d'acides aminés des protéines homologues hCks1 et hCks2. Les substitutions non conservatrices (rouge) et conservatrices (orange) d'acides aminés entre ces 2 protéines sont indiquées. De plus, les sérines phosphorylées sur hCks1 et leurs équivalents sur hCks2 sont encadrés en bleu (Sitry et al., 2002).

En comparant les séquences primaires des protéines humaines Cks1 et Cks2, nous avons observé que sur les deux sérines phosphorylées sur Cks1, uniquement la sérine 2 n'est pas conservée entre les deux protéines. En effet, dans hCks2, la sérine 2 est remplacée par une alanine (Fig.30). Ainsi, il semblait intéressant de vérifier si la protéine mutante Cks2 A2S, cette dernière possédant les deux sites de phosphorylation de Cks1, pouvait substituer Cks1 dans son rôle d'adaptateur. À la lumière de nos résultats, l'ajout de la sérine 2 ne permet pas à Cks2 d'interagir avec les deux partenaires de Cks1, Skp2 et p27 (voir figures 3A et 3B de l'article). Ainsi, la fonction adaptatrice spécifique à hCks1 dans le complexe SCF^{Skp2} n'est pas due à un site de phosphorylation supplémentaire en position 2, comparé à hCks2. Sachant que ces deux protéines partagent 81% d'homologie au niveau de leurs séquences d'acides aminés, la spécificité de hCks1 dans ce rôle d'adaptateur doit être causée par certains résidus bien spécifiques n'étant pas présent sur hCks2. Cette hypothèse a été vérifiée par Sitry et al qui ont montré que deux acides aminés présents dans l'hélice •2 étaient essentiels au rôle d'adaptateur de Cks1 (Hao et al., 2005; Sitry et al., 2002). Il s'agit de la sérine 41 et de l'asparagine 45, ces dernières étant remplacées respectivement par l'acide glutamique 41 et l'arginine 45 dans Cks2. En mutant l'un de ces résidus dans Cks1, cette protéine n'est plus capable de jouer son rôle d'adaptateur et l'ubiquitination de p27 ne se fait plus (Sitry et al., 2002). D'un autre côté, il a été montré qu'une forme mutante de

Cks2 du type Cks2 E41S R45N est capable de lier Skp2 et de supporter l'ubiquitination de p27, à la différence de la forme sauvage ou de notre forme mutante Cks2 A2S (Seeliger et al., 2003a).

4.5 Impact de la phosphorylation sur la localisation subcellulaire de Cks1.

En ce qui concerne la localisation subcellulaire de Cks1, les données sont rares et surtout très controversées. En effet, Wang et al ont montré que des protéines de fusion Cks1-GFP et Cks2-GFP, ces dernières ayant soit une étiquette en N- ou en C-terminal, sont distribuées équitablement dans le cytosol et le noyau lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules NIH 3T3 (Zhang et al., 2004). Cependant, d'après un papier de Dolcetti, Cks1 localise principalement dans le cytoplasme dans des lignées de lymphocytes B immortalisés, ceci ayant été confirmé par des expériences d'immuno-buvardage contre Cks1 sur des fractions cytoplasmiques et nucléaires (Zancai et al., 2005). Finalement, Lisztwan et al ainsi que Bashir et Pagano argumentent que Cks1 est trouvé exclusivement dans le noyau dans des cellules U2OS d'ostéosarcome humain (information non publiée de Pagano). Dans notre cas, dans des cellules Rat-1, nous avons observé que la construction Myc5-Cks1 se localise dans toute la cellule avec un marquage légèrement plus intense dans le noyau (voir figure 4A de l'article). De plus, afin de confirmer nos résultats, nous avons étudié la localisation subcellulaire dans ces mêmes Rat-1 d'une autre construction de Cks1, cette dernière possédant l'étiquette beaucoup plus petite HA. Nos résultats montrent que la localisation de ces 2 constructions de Cks1 est identique, ceci suggérant que la taille de l'étiquette Myc5 n'influence pas la localisation de Cks1 (Fig.31).

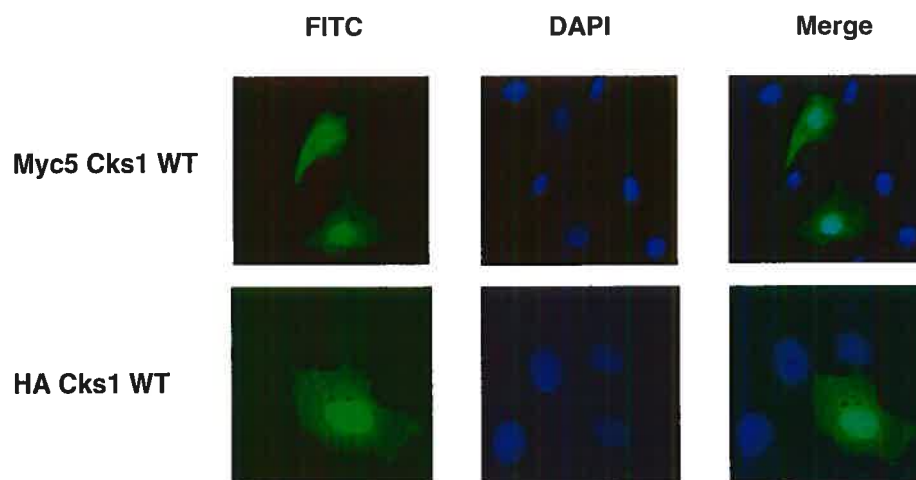


Figure 31 : La localisation subcellulaire de la protéine Cks1 exogène n'est pas influencée par la taille de l'épitope en N-terminal. Des cellules Rat-1 ont été transfectées avec les protéines sauvages Myc5 Cks1 ou HA Cks1. La localisation subcellulaire de ces protéines exogènes a été déterminée par immunofluorescence, après un marquage avec les anticorps primaires anti-Myc 9E10 et anti-HA Y11. Les noyaux des cellules ont été marqués avec du DAPI, et leur marquage a été superposé avec le marquage FITC.

Nous n'avons pas pu étudier la localisation de la protéine Cks1 endogène faute d'un anticorps de qualité. Cette étude n'a d'ailleurs jamais été faite d'après la littérature. Cette disparité entre ces différentes études incluant la nôtre est probablement due au fait que nous n'avons pas utilisé les mêmes lignées cellulaires. Ainsi, le contexte cellulaire serait important pour le contrôle de la localisation subcellulaire de Cks1. Des variations dans le niveau d'expression de certaines protéines en fonction des lignées pourraient expliquer ces différences de localisation. D'autres protéines, comme les kinases atypiques Erk3 et Erk4, voient aussi leur localisation subcellulaire varier en fonction de la lignée cellulaire utilisée (résultats non publiés).

La perte des sites de phosphorylation entraîne des changements dans la localisation subcellulaire de la protéine Cks1 surexprimée. En effet, alors qu'une très faible proportion des cellules montre spécifiquement un marquage cytoplasmique pour la construction Myc5-Cks1 sauvage (environ 7%), ce marquage cytoplasmique monte à environ 25% pour les mutants S2A et S51A de Cks1, et à environ 45% pour le double mutant non-phosphorylable S2-51A (voir figures 4A et 4B de l'article). Ceci suggère une interaction phospho-dépendante de Cks1 avec une protéine ou un complexe protéique situés hors du noyau. Plus précisément, il semble que le ou les candidats pour cette interaction cytoplasmique lient avec une plus grande affinité les formes non-phosphorylables de Cks1, et en particulier le double mutant S2-51A. La phospho-dépendance de cette interaction pourrait expliquer en partie les variations observées entre différentes lignées cellulaires en ce qui concerne la localisation subcellulaire de Cks1. En effet, étant donné que le niveau de phosphorylation de Cks1 et par conséquent sa localisation sont régulés par l'activité de kinases et de phosphatases, il est possible que des variations dans les niveaux d'expression de ces protéines dans différents types cellulaires entraînent des changements de localisation subcellulaire de l'adaptateur Cks1, ce dernier étant plus ou moins phosphorylé et par conséquent plus ou moins séquestré dans le cytoplasme. En ce qui concerne les différents mutants phosphomimétiques de Cks1, leur localisation subcellulaire est similaire à celle de la protéine sauvage exogène, confirmant un manque de mimétisme de ces constructions. D'un autre côté, en terme d'affinité d'interaction de Cks1, cette hypothèse de séquestration cytoplasmique phospho-dépendante est totalement inverse à celle postulée sur le rôle de la phosphorylation dans l'interaction de Cks1 avec ses partenaires de la transition G1/S, p27

et Skp2. En effet, alors que le double mutant non-phosphorylable S2-51A de Cks1 lie avec beaucoup moins d'affinité les protéines du complexe SCF^{Skp2} mentionnées ci-dessus, celui-ci semble interagir plus fortement avec son séquestreur potentiel dans le cytoplasme. Ainsi, la seule similitude est le fait que c'est le double mutant de Cks1, ce dernier ne possédant plus de site de phosphorylation, qui révèle à chaque fois la différence d'interaction la plus drastique comparée à la forme sauvage. Ceci suggère une collaboration de ces 2 sites sous la forme d'une surface de liaison à spécificité variable en fonction du statut de la phosphorylation à ces 2 sites. Cependant, cette séquestration cytoplasmique de la forme non-phosphorylable S2-51A de Cks1 soulève une autre question : est ce que la perte d'interaction de ce double mutant avec Skp2 et p27 est due à un problème de contact physique ou alors à son absence du noyau. Il serait possible de répondre à cette question en réalisant des essais d'interaction *in vitro* avec des protéines recombinantes. Une autre alternative plus physiologique serait de forcer la localisation nucléaire du mutant S2-51A en lui rajoutant un NLS, puis de déterminer son interaction avec Skp2 et p27 dans le noyau. Néanmoins, le fait que ce double mutant interagisse avec les CDKs nucléaires CDK1 et CDK2 au même niveau que la protéine sauvage surexprimée laisse penser que ces pertes d'interaction de Cks1 avec p27 et Skp2 ne sont pas dues à une séquestration cytosolique de Cks1, mais plutôt à des perturbations au niveau des interfaces d'interaction Cks1-Skp2 et Cks1-p27.

Suite au papier publié sur la séquestration de Cks1 à la membrane plasmique par FRS2, nous nous sommes demandés si cette protéine impliquée dans la signalisation FGF ne serait pas le candidat recherché, ceci nous permettant d'expliquer les résultats d'immunofluorescence (voir figure 4A de l'article). Cependant, nos données expérimentales ne supportent pas cette hypothèse. En effet, par co-immunoprécipitation, FRS2 interagit de la même façon avec toutes les formes de Cks1 (voir figure 4C de l'article). Il serait intéressant de confirmer ce résultat en transfectant successivement dans des cellules Rat1 un siRNA dirigé contre FRS2 puis la construction Myc5-Cks1 S2-51A, ces dernières étant par la suite fixées afin de déterminer par immunofluorescence la localisation de ce double mutant en l'absence de FRS2. Dans ces conditions, si FRS2 est le candidat recherché, nous devrions observer une relocalisation nucléaire de ce mutant, et par conséquent une proportion plus faible de marquage cytoplasmique, comparée au 45%

obtenu sans siRNA. Une autre hypothèse permettant d'expliquer nos résultats de localisation serait que la phosphorylation sur les sérines 2 et 51 affecte l'import ou l'export nucléaire de Cks1 en modulant son interaction avec un transporteur ou une nucléopore. Une dernière hypothèse serait d'envisager que l'accumulation cytoplasmique du double mutant S2-51A résulte uniquement de la perte d'association avec des protéines nucléaires telles que p27 et Skp2. Cependant, ceci est peu probable car Cks1 ne possède pas de NES. Finalement, une purification biochimique telle que le « tap-tag » sur des fractions cytoplasmiques et nucléaires pures pourrait se révéler judicieuse pour découvrir la protéine ou le complexe protéique à l'origine des variations de localisation subcellulaire de Cks1 en fonction de sa phosphorylation.

4.6 Perspectives de ce projet.

Comme il a été discuté déjà auparavant, l'identification de certains partenaires clés de l'adaptateur Cks1, notamment son séquestreur cytoplasmique ainsi que les kinases et phosphatases responsables de sa phosphorylation, est essentielle en vue d'avoir un schéma plus détaillé des mécanismes de régulation de cette protéine. Les méthodes expérimentales qui semblent le mieux adaptées à ces objectifs sont dans un premier temps des purifications biochimiques classiques ou en plusieurs étapes telles que le « tap-tag ». Par la suite, afin de confirmer les résultats des purifications, il sera important d'étudier la régulation de la phosphorylation de Cks1 dans le cycle cellulaire, par exemple en utilisant des anticorps phosphospécifiques contre les 2 sites identifiés. D'un autre côté, afin de donner du poids à notre découverte, nous tentons actuellement de développer plusieurs essais fonctionnels qui visent à mettre en évidence l'importance de ces 2 sites de phosphorylation dans l'activité de Cks1 au sein du complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2}, et par conséquent dans la dégradation de p27 à la transition G1/S du cycle cellulaire. Nous avons déjà essayé en vain de développer dans des cellules Rat-1 un essai basé sur un siRNA dirigé contre la région 3'UTR de Cks1 de rat. Plus précisément, le but était de rétablir le niveau basal de p27 en transfectant dans des cellules prétraitées avec un siRNA contre Cks1 la construction Myc-Cks1 sauvage. Il était ensuite prévu de transfecter les différentes formes non-phosphorylables de Cks1 à la place de la forme sauvage pour déterminer leur capacité respective à rétablir ou plutôt réduire les niveaux de p27 ayant augmenté suite au traitement des cellules avec le siRNA mentionné ci-dessus. Il était attendu que le double mutant S2-51A de Cks1 ne puisse pas rétablir le niveau basal de p27 dû à son incapacité à interagir avec Skp2 et p27. Cependant, en raison de problèmes techniques, notamment la toxicité d'une double transfection en 48h, nous n'avons pas été capables de mettre au point ce système fonctionnel. Comme alternative, par marquage au BrdU, nous avons regardé si la transfection de Myc5-Cks1 sauvage dans des cellules Rat-1 augmentait leur entrée en phase S due à une dégradation accélérée de p27. Malheureusement, à la différence de Skp2, la surexpression de Cks1 n'a pas causé d'augmentation dans la proportion de cellules en phase S, comparé à des cellules non-transfectées. Suite à ces deux échecs, nous nous sommes lancés dans la mise au point d'un essai d'ubiquitination *in vivo* de p27. Autrement

dit, nous voulons transfecter des cellules HEK293 avec tous les éléments spécifiques du complexe SCF^{Skp2}, c'est-à-dire Cullin1, Rbx1, Skp1, Skp2 et Cks1, puis essayer de les immunoprécipiter sous la forme d'un complexe. Ensuite, en ajoutant à ce complexe purifié une solution contenant essentiellement les enzymes E1, E2, des molécules d'ubiquitine et de l'ATP, nous espérons ubiquitiner p27 traduit *in vitro*. Dans ce cas là aussi, nous nous attendons à ce que le complexe purifié contenant les formes non-phosphorylables de Cks1, notamment le mutant S2-51A, ne soit pas fonctionnel dans l'ubiquitination de p27. Finalement, depuis peu, nous disposons de MEFs Cks1^{-/-}. Par conséquent, dans cette lignée cellulaire, nous allons refaire les deux essais qui n'ont pas réussi auparavant dans les Rat-1, autrement dit, le marquage au BrdU ainsi que le rétablissement du niveau de p27 suite à l'infection de ces cellules avec la protéine sauvage et les mutants non-phosphorylables de Cks1.

À plus long terme, il serait intéressant de développer la souris knock-in S2-51A pour les sérines 2 et 51 phosphorylées afin de voir l'impact phénotypique de l'absence de ces sites de phosphorylation dans cette souris. Finalement, d'après nos différents résultats, il se pourrait que des lignées cellulaires cancéreuses soient caractérisées par une hyperphosphorylation de Cks1, car ces conditions sont optimales pour que cette protéine ne soit pas séquestrée dans le cytoplasme et par conséquent accumule dans le noyau en vue d'accélérer la dégradation de p27 et de déréguler le cycle cellulaire. Pour vérifier cette hypothèse, il serait envisageable d'utiliser des anticorps phospho-spécifiques dirigés contre les sérines 2 et 51 phosphorylées afin d'effectuer des expériences d'immunohistochimie sur des tissus cancéreux et normaux de patients avec différents carcinomes et de corrélérer ces observations avec le stade et la progression des tumeurs.

5. CONCLUSION

La perte ou la diminution du niveau d'expression de p27 dans différents carcinomes est rarement due à des mutations génétiques, mais plutôt à une dérégulation du système ubiquitine-protéasome dégradant spécifiquement ce CKI. En effet, cette sous-expression de p27, observée dans environ 50% des cancers humains, est souvent causée par une surexpression des sous-unités catalytiques et adaptatrices du complexe ubiquitine ligase SCF^{Skp2}, notamment Skp2 et Cks1 (Slingerland and Pagano, 2000). Depuis quelques années, l'intérêt des chercheurs en ce qui concerne le rôle de Cks1 dans le développement tumoral est grandissant. Ainsi, plusieurs articles ont montré une corrélation significative entre la surexpression de Cks1 et la perte de différenciation des tumeurs, un stade avancé de la maladie ainsi qu'une diminution des chances de survie des patients (Shapira et al., 2004; Shapira et al., 2005). Toutes ces données cliniques soulignent le fait qu'enrayer la dégradation de p27 dans les tumeurs devient l'un des défis thérapeutiques anti-cancer les plus importants des prochaines années. Dans cette optique, plusieurs groupes ont déjà essayé de traiter des lignées cellulaires cancéreuses avec un siRNA dirigé contre le proto-oncogène Cks1 (Kitajima et al., 2004; Tsai et al., 2005). Les résultats se sont révélés prometteurs puisque suite à ce traitement, les cellules cancéreuses se sont soit arrêtées en G1 suite à l'accumulation de p27, soit en G2/M avant de rentrer en apoptose (Kitajima et al., 2004; Tsai et al., 2005).

Cependant, afin de bloquer la protéolyse incontrôlée de p27 dans les cancers, nous devons tout d'abord mieux caractériser son système de dégradation, en particulier les détails de la structure du complexe SCF^{Skp2} mais aussi les mécanismes de régulation des différentes protéines du système, notamment ceux de l'adaptateur Cks1. Très récemment, la description du complexe Skp1-Skp2-Cks1-p27 suite à des études cristallographiques a permis de mettre à jour le mode d'assemblage de ces 4 protéines ainsi que les acides aminés essentiels à ces interactions sur chaque protéine (Hao et al., 2005). De plus, cette analyse cristallographique a montré que les propriétés structurales de l'interface d'interaction entre p27 et Cks1-Skp2 pourraient permettre l'utilisation de petites molécules inhibitrices pour éviter la dégradation anarchique de p27 (Hao et al., 2005). Dans cette idée, le groupe de

Vassilev a réalisé un criblage à haut débit pour des petites molécules inhibant l'interaction Cks1-Skp2 (Huang and Vassilev, 2005).

Les résultats de nos travaux apportent de nombreuses informations cruciales à la compréhension du mode d'activation de Cks1. En effet, nos résultats montrent tout d'abord que les deux sites de phosphorylation identifiés sur Cks1, soit les sérines 2 et 51, sont essentiels à l'interaction de cette protéine avec non seulement son partenaire Skp2 mais aussi le substrat p27. De plus, nous avons également démontré au cours de cette étude qu'une forme non-phosphorylable de Cks1, en plus d'avoir une très faible affinité pour Skp2 et p27, est préférentiellement séquestrée dans le cytoplasme, et par conséquent ne peut pas être impliquée dans la dégradation de p27. Ces données semblent donc suggérer qu'une forme hyperphosphorylée de Cks1 dans des tissus cancéreux pourrait avoir une activité maximale en terme de dégradation de p27, ce qui causerait une prolifération anarchique des cellules tumorales. Ainsi, ces informations ont un grand potentiel thérapeutique anti-cancer car l'inhibition de la phosphorylation de Cks1, en bloquant l'accès aux sérines 2 et 51 ou en interférant avec l'activité de kinases spécifiques, pourrait théoriquement diminuer la dégradation de p27 et rétablir le niveau basal de ce CKI dans des tissus cancéreux.

6. BIBLIOGRAPHIE

- Abriel, H., Loffing, J., Rebhun, J. F., Pratt, J. H., Schild, L., Horisberger, J. D., Rotin, D., and Staub, O. (1999). Defective regulation of the epithelial Na⁺ channel by Nedd4 in Liddle's syndrome. *J Clin Invest* *103*, 667-673.
- Agrawal, D., Dong, F., Wang, Y. Z., Kayda, D., and Pledger, W. J. (1995). Regulation of cyclin E and p27kip during mitosis in BALB/c 3T3 cells. *Cell Growth Differ* *6*, 1199-1205.
- Agrawal, D., Hauser, P., McPherson, F., Dong, F., Garcia, A., and Pledger, W. J. (1996). Repression of p27kip1 synthesis by platelet-derived growth factor in BALB/c 3T3 cells. *Mol Cell Biol* *16*, 4327-4336.
- Alves-Rodrigues, A., Gregori, L., and Figueiredo-Pereira, M. E. (1998). Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci* *21*, 516-520.
- Aprelikova, O., Xiong, Y., and Liu, E. T. (1995). Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *J Biol Chem* *270*, 18195-18197.
- Arvai, A. S., Bourne, Y., Hickey, M. J., and Tainer, J. A. (1995). Crystal structure of the human cell cycle protein CksHs1: single domain fold with similarity to kinase N-lobe domain. *J Mol Biol* *249*, 835-842.
- Attal, J., Theron, M. C., Puissant, C., and Houdebine, L. M. (1999). Effect of intercistronic length on internal ribosome entry site (IRES) efficiency in bicistronic mRNA. *Gene Expr* *8*, 299-309.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2001). p27 destruction: Cks1 pulls the trigger. *Nat Cell Biol* *3*, E95-98.
- Bashir, T., Dorrello, N. V., Amador, V., Guardavaccaro, D., and Pagano, M. (2004). Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* *428*, 190-193.
- Bashir, T., and Pagano, M. (2004). Don't skip the G1 phase: how APC/CCdh1 keeps SCFSKP2 in check. *Cell Cycle* *3*, 850-852.
- Bassermann, F., von Klitzing, C., Munch, S., Bai, R. Y., Kawaguchi, H., Morris, S. W., Peschel, C., and Duyster, J. (2005). NIPA defines an SCF-type mammalian E3 ligase that regulates mitotic entry. *Cell* *122*, 45-57.
- Besson, A., Gurian-West, M., Schmidt, A., Hall, A., and Roberts, J. M. (2004). p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev* *18*, 862-876.

Blain, S. W., Scher, H. I., Cordon-Cardo, C., and Koff, A. (2003). p27 as a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 3, 111-115.

Bloom, J., and Pagano, M. (2003). Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin Cancer Biol* 13, 41-47.

Boehm, M., Yoshimoto, T., Crook, M. F., Nallamshetty, S., True, A., Nabel, G. J., and Nabel, E. G. (2002). A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *Embo J* 21, 3390-3401.

Bondar, T., Kalinina, A., Khair, L., Kopanja, D., Nag, A., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (2006). Cul4A and DDB1 associate with Skp2 to target p27Kip1 for proteolysis involving the COP9 signalosome. *Mol Cell Biol* 26, 2531-2539.

Bornstein, G., Bloom, J., Sitry-Shevah, D., Nakayama, K., Pagano, M., and Hershko, A. (2003). Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* 278, 25752-25757.

Bouchard, C., Thieke, K., Maier, A., Saffrich, R., Hanley-Hyde, J., Ansorge, W., Reed, S., Sicinski, P., Bartek, J., and Eilers, M. (1999). Direct induction of cyclin D2 by Myc contributes to cell cycle progression and sequestration of p27. *Embo J* 18, 5321-5333.

Bourne, Y., Watson, M. H., Hickey, M. J., Holmes, W., Rocque, W., Reed, S. I., and Tainer, J. A. (1996). Crystal structure and mutational analysis of the human CDK2 kinase complex with cell cycle-regulatory protein CksHs1. *Cell* 84, 863-874.

Boyer, S. N., Wazer, D. E., and Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 4620-4624.

Buchkovich, K., Duffy, L. A., and Harlow, E. (1989). The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* 58, 1097-1105.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282, 1497-1501.

Calkhoven, C. F., Muller, C., and Leutz, A. (2002). Translational control of gene expression and disease. *Trends Mol Med* 8, 577-583.

Cardozo, T., and Pagano, M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 739-751.

Cariou, S., Catzavelos, C., and Slingerland, J. M. (1998). Prognostic implications of expression of the cell cycle inhibitor protein p27Kip1. *Breast Cancer Res Treat* 52, 29-41.

Carrano, A. C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol* 1, 193-199.

Catzavelos, C., Bhattacharya, N., Ung, Y. C., Wilson, J. A., Roncari, L., Sandhu, C., Shaw, P., Yeger, H., Morava-Protzner, I., Kapusta, L., *et al.* (1997). Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 3, 227-230.

Chan, L. C., Kwong, Y. L., Liu, H. W., Lee, C. P., Lie, K. W., and Chan, A. Y. (1992). Deletion 12p in de novo acute myeloid leukemia. An association with early progenitor cell. *Cancer Genet Cytogenet* 62, 47-49.

Chen, P. L., Scully, P., Shew, J. Y., Wang, J. Y., and Lee, W. H. (1989). Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 58, 1193-1198.

Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J. A., Fero, M., Roussel, M. F., Roberts, J. M., and Sherr, C. J. (1999). The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* 18, 1571-1583.

Chiarle, R., Budel, L. M., Skolnik, J., Frizzera, G., Chilosi, M., Corato, A., Pizzolo, G., Magidson, J., Montagnoli, A., Pagano, M., *et al.* (2000). Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood* 95, 619-626.

Ciaparrone, M., Yamamoto, H., Yao, Y., Sgambato, A., Cattoretti, G., Tomita, N., Monden, T., Rotterdam, H., and Weinstein, I. B. (1998). Localization and expression of p27KIP1 in multistage colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 58, 114-122.

Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J* 17, 7151-7160.

Coats, S., Flanagan, W. M., Nourse, J., and Roberts, J. M. (1996). Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 272, 877-880.

Coats, S., Whyte, P., Fero, M. L., Lacy, S., Chung, G., Randel, E., Firpo, E., and Roberts, J. M. (1999). A new pathway for mitogen-dependent cdk2 regulation uncovered in p27(Kip1)-deficient cells. *Curr Biol* 9, 163-173.

Coulombe, P., Rodier, G., Bonneil, E., Thibault, P., and Meloche, S. (2004). N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Mol Cell Biol* 24, 6140-6150.

DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Lynch, D., Furukawa, Y., Griffin, J., Pivnicka-Worms, H., Huang, C. M., and Livingston, D. M. (1989). The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. *Cell* 58, 1085-1095.

Decker, H. J., Li, F. P., Bixenman, H. A., and Sandberg, A. A. (1990). Chromosome 3 and 12p rearranged in a well-differentiated peritoneal mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 46, 135-137.

Demetrick, D. J., Zhang, H., and Beach, D. H. (1996). Chromosomal mapping of the human genes CKS1 to 8q21 and CKS2 to 9q22. *Cytogenet Cell Genet* 73, 250-254.

Dijkers, P. F., Medema, R. H., Pals, C., Banerji, L., Thomas, N. S., Lam, E. W., Burgering, B. M., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L., and Coffey, P. J. (2000). Forkhead transcription factor FKHR-L1 modulates cytokine-dependent transcriptional regulation of p27(KIP1). *Mol Cell Biol* 20, 9138-9148.

Donovan, P. J., and Reed, S. I. (2003). Germline exclusion of Cks1 in the mouse reveals a metaphase I role for Cks proteins in male and female meiosis. *Cell Cycle* 2, 275-276.

Egan, E. A., and Solomon, M. J. (1998). Cyclin-stimulated binding of Cks proteins to cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 18, 3659-3667.

el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Eymin, B., Sordet, O., Droin, N., Munsch, B., Haugg, M., Van de Craen, M., Vandenabeele, P., and Solary, E. (1999). Caspase-induced proteolysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 mediates its anti-apoptotic activity. *Oncogene* 18, 4839-4847.

Fan, G. K., Fujieda, S., Sunaga, H., Tsuzuki, H., Ito, N., and Saito, H. (1999). Expression of protein p27 is associated with progression and prognosis in laryngeal cancer. *Laryngoscope* 109, 815-820.

Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M. W. (1998). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol Cell* 2, 163-171.

Fero, M. L., Randel, E., Gurley, K. E., Roberts, J. M., and Kemp, C. J. (1998). The murine gene p27Kip1 is haplo-insufficient for tumour suppression. *Nature* 396, 177-180.

Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M., *et al.* (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell* 85, 733-744.

Fleurent, M., Gingras, A. C., Sonenberg, N., and Meloche, S. (1997). Angiotensin II stimulates phosphorylation of the translational repressor 4E-binding protein 1 by a mitogen-activated protein kinase-independent mechanism. *J Biol Chem* 272, 4006-4012.

- Ganoth, D., Bornstein, G., Ko, T. K., Larsen, B., Tyers, M., Pagano, M., and Hershko, A. (2001). The cell-cycle regulatory protein Cks1 is required for SCF(Skp2)-mediated ubiquitinylation of p27. *Nat Cell Biol* 3, 321-324.
- Gelman, M. S., and Kopito, R. R. (2002). Rescuing protein conformation: prospects for pharmacological therapy in cystic fibrosis. *J Clin Invest* 110, 1591-1597.
- Giot, L., Bader, J. S., Brouwer, C., Chaudhuri, A., Kuang, B., Li, Y., Hao, Y. L., Ooi, C. E., Godwin, B., Vitols, E., *et al.* (2003). A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science* 302, 1727-1736.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Golan, A., Yudkovsky, Y., and Hershko, A. (2002). The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem* 277, 15552-15557.
- Gopfert, U., Kullmann, M., and Hengst, L. (2003). Cell cycle-dependent translation of p27 involves a responsive element in its 5'-UTR that overlaps with a uORF. *Hum Mol Genet* 12, 1767-1779.
- Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Mendenhall, M. D., and Reed, S. I. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* CKS1 gene, a homolog of the *Schizosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the Cdc28 protein kinase complex. *Mol Cell Biol* 9, 2034-2041.
- Hao, B., Zheng, N., Schulman, B. A., Wu, G., Miller, J. J., Pagano, M., and Pavletich, N. P. (2005). Structural basis of the Cks1-dependent recognition of p27(Kip1) by the SCF(Skp2) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 20, 9-19.
- Hara, T., Kamura, T., Nakayama, K., Oshikawa, K., and Hatakeyama, S. (2001). Degradation of p27(Kip1) at the G(0)-G(1) transition mediated by a Skp2-independent ubiquitination pathway. *J Biol Chem* 276, 48937-48943.
- Harper, J. W. (2001). Protein destruction: adapting roles for Cks proteins. *Curr Biol* 11, R431-435.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75, 805-816.
- Hattori, T., Kitagawa, K., Uchida, C., Oda, T., and Kitagawa, M. (2003). Cks1 is degraded via the ubiquitin-proteasome pathway in a cell cycle-dependent manner. *Genes Cells* 8, 889-896.

Hayles, J., Beach, D., Durkacz, B., and Nurse, P. (1986). The fission yeast cell cycle control gene *cdc2*: isolation of a sequence *suc1* that suppresses *cdc2* mutant function. *Mol Gen Genet* 202, 291-293.

Hengst, L. (2004). A second RING to destroy p27(Kip1). *Nat Cell Biol* 6, 1153-1155.

Hengst, L., Dulic, V., Slingerland, J. M., Lees, E., and Reed, S. I. (1994). A cell cycle-regulated inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5291-5295.

Higa, L. A., Yang, X., Zheng, J., Banks, D., Wu, M., Ghosh, P., Sun, H., and Zhang, H. (2006). Involvement of CUL4 Ubiquitin E3 ligases in Regulating CDK Inhibitors Dacapo/p27(Kip1) and Cyclin E Degradation. *Cell Cycle* 5, 71-77.

Higashitsuji, H., Itoh, K., Nagao, T., Dawson, S., Nonoguchi, K., Kido, T., Mayer, R. J., Arii, S., and Fujita, J. (2000). Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. *Nat Med* 6, 96-99.

Hixon, M. L., Obejero-Paz, C., Muro-Cacho, C., Wagner, M. W., Millie, E., Nagy, J., Hassold, T. J., and Gualberto, A. (2000). Cks1 mediates vascular smooth muscle cell polyploidization. *J Biol Chem* 275, 40434-40442.

Huang, K. S., and Vassilev, L. T. (2005). High-throughput screening for inhibitors of the cks1-skp2 interaction. *Methods Enzymol* 399, 717-728.

Imaki, H., Nakayama, K., Delehouzee, S., Handa, H., Kitagawa, M., Kamura, T., and Nakayama, K. I. (2003). Cell cycle-dependent regulation of the Skp2 promoter by GA-binding protein. *Cancer Res* 63, 4607-4613.

Inui, N., Kitagawa, K., Miwa, S., Hattori, T., Chida, K., Nakamura, H., and Kitagawa, M. (2003). High expression of Cks1 in human non-small cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* 303, 978-984.

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376, 313-320.

Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2003). Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10231-10236.

Kamura, T., Hara, T., Matsumoto, M., Ishida, N., Okumura, F., Hatakeyama, S., Yoshida, M., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2004). Cytoplasmic ubiquitin ligase KPC regulates proteolysis of p27(Kip1) at G1 phase. *Nat Cell Biol* 6, 1229-1235.

Katner, A. L., Hoang, Q. B., Gootam, P., Jaruga, E., Ma, Q., Gnarr, J., and Rayford, W. (2002). Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human prostate carcinoma cells by a recombinant adenovirus expressing p27(Kip1). *Prostate* 53, 77-87.

Kato, J. Y., Matsuoka, M., Polyak, K., Massague, J., and Sherr, C. J. (1994). Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79, 487-496.

Kato, R., and Ogawa, H. (1994). An essential gene, *ESR1*, is required for mitotic cell growth, DNA repair and meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 22, 3104-3112.

Kawamata, N., Morosetti, R., Miller, C. W., Park, D., Spirin, K. S., Nakamaki, T., Takeuchi, S., Hatta, Y., Simpson, J., Wilczynski, S., and et al. (1995). Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 55, 2266-2269.

Keyomarsi, K., and Herliczek, T. W. (1997). The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Prog Cell Cycle Res* 3, 171-191.

Kitajima, S., Kudo, Y., Ogawa, I., Bashir, T., Kitagawa, M., Miyauchi, M., Pagano, M., and Takata, T. (2004). Role of Cks1 overexpression in oral squamous cell carcinomas: cooperation with Skp2 in promoting p27 degradation. *Am J Pathol* 165, 2147-2155.

Kiyokawa, H., Kineman, R. D., Manova-Todorova, K. O., Soares, V. C., Hoffman, E. S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A. C., Frohman, L. A., and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell* 85, 721-732.

Kramer, E. R., Scheuringer, N., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Peters, J. M. (2000). Mitotic regulation of the APC activator proteins CDC20 and CDH1. *Mol Biol Cell* 11, 1555-1569.

Kudo, Y., Kitajima, S., Ogawa, I., Miyauchi, M., and Takata, T. (2005). Down-regulation of Cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 41, 105-116.

Kwon, T. K., Nagel, J. E., Buchholz, M. A., and Nordin, A. A. (1996). Characterization of the murine cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27Kip1. *Gene* 180, 113-120.

L'Allemain, G., Lavoie, J. N., Rivard, N., Baldin, V., and Pouyssegur, J. (1997). Cyclin D1 expression is a major target of the cAMP-induced inhibition of cell cycle entry in fibroblasts. *Oncogene* 14, 1981-1990.

Lee, J. M., and Bernstein, A. (1993). p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5742-5746.

Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M. G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12616-12621.

Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M. K., Han, K., Lee, J. H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., *et al.* (2002). PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8, 1153-1160.

Lin, D. I., and Diehl, J. A. (2004). Mechanism of cell-cycle control: ligating the ligase. *Trends Biochem Sci* 29, 453-455.

Lin, H. R., Chuang, L. C., Boix-Perales, H., Philpott, A., and Yew, P. R. (2006). Ubiquitination of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor, Xic1, is Mediated by the Xenopus F-box Protein xSkp2. *Cancer Biol Ther* 5, 304-314.

Loda, M., Cukor, B., Tam, S. W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G. F., Jessup, J. M., and Pagano, M. (1997). Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med* 3, 231-234.

Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9, 935-944.

Malek, N. P., Sundberg, H., McGrew, S., Nakayama, K., Kyriakides, T. R., and Roberts, J. M. (2001). A mouse knock-in model exposes sequential proteolytic pathways that regulate p27Kip1 in G1 and S phase. *Nature* 413, 323-327.

Masciullo, V., Sgambato, A., Pacilio, C., Pucci, B., Ferrandina, G., Palazzo, J., Carbone, A., Cittadini, A., Mancuso, S., Scambia, G., and Giordano, A. (1999). Frequent loss of expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 59, 3790-3794.

Medema, R. H., Kops, G. J., Bos, J. L., and Burgering, B. M. (2000). AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature* 404, 782-787.

Millard, S. S., Vidal, A., Markus, M., and Koff, A. (2000). A U-rich element in the 5' untranslated region is necessary for the translation of p27 mRNA. *Mol Cell Biol* 20, 5947-5959.

Millard, S. S., Yan, J. S., Nguyen, H., Pagano, M., Kiyokawa, H., and Koff, A. (1997). Enhanced ribosomal association of p27(Kip1) mRNA is a mechanism contributing to accumulation during growth arrest. *J Biol Chem* 272, 7093-7098.

Miskimins, W. K., Wang, G., Hawkinson, M., and Miskimins, R. (2001). Control of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 expression by cap-independent translation. *Mol Cell Biol* 21, 4960-4967.

Mizumatsu, S., Tamiya, T., Ono, Y., Abe, T., Matsumoto, K., Furuta, T., and Ohmoto, T. (1999). Expression of cell cycle regulator p27Kip1 is correlated with survival of patients with astrocytoma. *Clin Cancer Res* 5, 551-557.

Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A. C., Draetta, G. F., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* 13, 1181-1189.

Moreno, S., Hayles, J., and Nurse, P. (1989). Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell* 58, 361-372.

Mori, M., Mimori, K., Shiraishi, T., Tanaka, S., Ueo, H., Sugimachi, K., and Akiyoshi, T. (1997). p27 expression and gastric carcinoma. *Nat Med* 3, 593.

Morris, M. C., Kaiser, P., Rudyak, S., Baskerville, C., Watson, M. H., and Reed, S. I. (2003). Cks1-dependent proteasome recruitment and activation of CDC20 transcription in budding yeast. *Nature* 423, 1009-1013.

Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A., and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* 4, 1449-1452.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., and Loh, D. Y. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85, 707-720.

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Matsumoto, M., Nakamichi, I., Kitagawa, K., Shirane, M., Tsunematsu, R., Tsukiyama, T., Ishida, N., *et al.* (2000). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *Embo J* 19, 2069-2081.

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K. I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 6, 661-672.

Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., and Nakayama, K. (2001). Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 853-860.

Newcomb, E. W., Sosnow, M., Demopoulos, R. I., Zeleniuch-Jacquotte, A., Sorich, J., and Speyer, J. L. (1999). Expression of the cell cycle inhibitor p27KIP1 is a new prognostic marker associated with survival in epithelial ovarian tumors. *Am J Pathol* 154, 119-125.

Ohta, T., Michel, J. J., Schottelius, A. J., and Xiong, Y. (1999). ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol Cell* 3, 535-541.

Orend, G., Hunter, T., and Ruoslahti, E. (1998). Cytoplasmic displacement of cyclin E-cdk2 inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 in anchorage-independent cells. *Oncogene* 16, 2575-2583.

- Ortolan, T. G., Tongaonkar, P., Lambertson, D., Chen, L., Schaubert, C., and Madura, K. (2000). The DNA repair protein rad23 is a negative regulator of multi-ubiquitin chain assembly. *Nat Cell Biol* 2, 601-608.
- Ouellet, V., Provencher, D. M., Maugard, C. M., Le Page, C., Ren, F., Lussier, C., Novak, J., Ge, B., Hudson, T. J., Tonin, P. N., and Mes-Masson, A. M. (2005). Discrimination between serous low malignant potential and invasive epithelial ovarian tumors using molecular profiling. *Oncogene* 24, 4672-4687.
- Pagano, M., Tam, S. W., Theodoras, A. M., Beer-Romero, P., Del Sal, G., Chau, V., Yew, P. R., Draetta, G. F., and Rolfe, M. (1995). Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269, 682-685.
- Patra, D., and Dunphy, W. G. (1996). Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev* 10, 1503-1515.
- Perez-Roger, I., Kim, S. H., Griffiths, B., Sewing, A., and Land, H. (1999). Cyclins D1 and D2 mediate myc-induced proliferation via sequestration of p27(Kip1) and p21(Cip1). *Embo J* 18, 5310-5320.
- Pfleger, C. M., and Kirschner, M. W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14, 655-665.
- Philipp-Staheli, J., Payne, S. R., and Kemp, C. J. (2001). p27(Kip1): regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res* 264, 148-168.
- Pietenpol, J. A., Bohlander, S. K., Sato, Y., Papadopoulos, N., Liu, B., Friedman, C., Trask, B. J., Roberts, J. M., Kinzler, K. W., Rowley, J. D., and et al. (1995). Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res* 55, 1206-1210.
- Piva, R., Cancelli, I., Cavalla, P., Bortolotto, S., Dominguez, J., Draetta, G. F., and Schiffer, D. (1999). Proteasome-dependent degradation of p27/kip1 in gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 691-696.
- Piva, R., Cavalla, P., Bortolotto, S., Cordera, S., Richiardi, P., and Schiffer, D. (1997). p27/kip1 expression in human astrocytic gliomas. *Neurosci Lett* 234, 127-130.
- Polinko, E. S., and Strome, S. (2000). Depletion of a Cks homolog in *C. elegans* embryos uncovers a post-metaphase role in both meiosis and mitosis. *Curr Biol* 10, 1471-1474.
- Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., and Koff, A. (1994a). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes Dev* 8, 9-22.

Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P., and Massague, J. (1994b). Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 78, 59-66.

Ponce-Castaneda, M. V., Lee, M. H., Latres, E., Polyak, K., Lacombe, L., Montgomery, K., Mathew, S., Krauter, K., Sheinfeld, J., Massague, J., and et al. (1995). p27Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 55, 1211-1214.

Poon, R. Y., Toyoshima, H., and Hunter, T. (1995). Redistribution of the CDK inhibitor p27 between different cyclin-CDK complexes in the mouse fibroblast cell cycle and in cells arrested with lovastatin or ultraviolet irradiation. *Mol Biol Cell* 6, 1197-1213.

Reed, S. I. (2003). Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 855-864.

Reynard, G. J., Reynolds, W., Verma, R., and Deshaies, R. J. (2000). Cks1 is required for G(1) cyclin-cyclin-dependent kinase activity in budding yeast. *Mol Cell Biol* 20, 5858-5864.

Richardson, H. E., Stueland, C. S., Thomas, J., Russell, P., and Reed, S. I. (1990). Human cDNAs encoding homologs of the small p34Cdc28/Cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* 4, 1332-1344.

Rivard, N., L'Allemain, G., Bartek, J., and Pouyssegur, J. (1996). Abrogation of p27Kip1 by cDNA antisense suppresses quiescence (G0 state) in fibroblasts. *J Biol Chem* 271, 18337-18341.

Rodier, G., Makris, C., Coulombe, P., Scime, A., Nakayama, K., Nakayama, K. I., and Meloche, S. (2005). p107 inhibits G1 to S phase progression by down-regulating expression of the F-box protein Skp2. *J Cell Biol* 168, 55-66.

Rodier, G., Montagnoli, A., Di Marcotullio, L., Coulombe, P., Draetta, G. F., Pagano, M., and Meloche, S. (2001). p27 cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation on Ser10 and is not a prerequisite for its proteolysis. *Embo J* 20, 6672-6682.

Rudner, A. D., and Murray, A. W. (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* 149, 1377-1390.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., and Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* 382, 325-331.

Schmider-Ross, A., Pirsig, O., Gottschalk, E., Denkert, C., Lichtenegger, W., and Reles, A. (2006). Cyclin-dependant kinase inhibitors CIP1 (p21) and KIP1 (p27) in ovarian cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 132, 163-170.

Schulman, B. A., Carrano, A. C., Jeffrey, P. D., Bowen, Z., Kinnucan, E. R., Finnin, M. S., Elledge, S. J., Harper, J. W., Pagano, M., and Pavletich, N. P. (2000). Insights into SCF ubiquitin ligases from the structure of the Skp1-Skp2 complex. *Nature* *408*, 381-386.

Schupbach, T., and Wieschaus, E. (1989). Female sterile mutations on the second chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect mutations. *Genetics* *121*, 101-117.

Seeliger, M. A., Breward, S. E., Friedler, A., Schon, O., and Itzhaki, L. S. (2003a). Cooperative organization in a macromolecular complex. *Nat Struct Biol* *10*, 718-724.

Seeliger, M. A., Breward, S. E., and Itzhaki, L. S. (2003b). Weak cooperativity in the core causes a switch in folding mechanism between two proteins of the cks family. *J Mol Biol* *325*, 189-199.

Seeliger, M. A., Spichty, M., Kelly, S. E., Bycroft, M., Freund, S. M., Karplus, M., and Itzhaki, L. S. (2005). Role of conformational heterogeneity in domain swapping and adapter function of the Cks proteins. *J Biol Chem* *280*, 30448-30459.

Servant, M. J., Coulombe, P., Turgeon, B., and Meloche, S. (2000). Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* *148*, 543-556.

Shapira, M., Ben-Izhak, O., Bishara, B., Futerman, B., Minkov, I., Krausz, M. M., Pagano, M., and Hershko, D. D. (2004). Alterations in the expression of the cell cycle regulatory protein cyclin kinase subunit 1 in colorectal carcinoma. *Cancer* *100*, 1615-1621.

Shapira, M., Ben-Izhak, O., Linn, S., Futerman, B., Minkov, I., and Hershko, D. D. (2005). The prognostic impact of the ubiquitin ligase subunits Skp2 and Cks1 in colorectal carcinoma. *Cancer* *103*, 1336-1346.

Sherr, C. J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* *2*, 103-112.

Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* *13*, 1501-1512.

Shin, I., Yakes, F. M., Rojo, F., Shin, N. Y., Bakin, A. V., Baselga, J., and Arteaga, C. L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* *8*, 1145-1152.

Shirane, M., Harumiya, Y., Ishida, N., Hirai, A., Miyamoto, C., Hatakeyama, S., Nakayama, K., and Kitagawa, M. (1999). Down-regulation of p27(Kip1) by two mechanisms, ubiquitin-mediated degradation and proteolytic processing. *J Biol Chem* *274*, 13886-13893.

Simon, K. E., Cha, H. H., and Firestone, G. L. (1995). Transforming growth factor beta down-regulation of CKShs1 transcripts in growth-inhibited epithelial cells. *Cell Growth Differ* 6, 1261-1269.

Singh, S. P., Lipman, J., Goldman, H., Ellis, F. H., Jr., Aizenman, L., Cangi, M. G., Signoretti, S., Chiaur, D. S., Pagano, M., and Loda, M. (1998). Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 58, 1730-1735.

Sitry, D., Seeliger, M. A., Ko, T. K., Ganoth, D., Breward, S. E., Itzhaki, L. S., Pagano, M., and Hershko, A. (2002). Three different binding sites of Cks1 are required for p27-ubiquitin ligation. *J Biol Chem* 277, 42233-42240.

Slingerland, J., and Pagano, M. (2000). Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 183, 10-17.

Slingerland, J. M., Hengst, L., Pan, C. H., Alexander, D., Stampfer, M. R., and Reed, S. I. (1994). A novel inhibitor of cyclin-Cdk activity detected in transforming growth factor beta-arrested epithelial cells. *Mol Cell Biol* 14, 3683-3694.

Slotky, M., Shapira, M., Ben-Izhak, O., Linn, S., Futerman, B., Tsalic, M., and Hershko, D. D. (2005). The expression of the ubiquitin ligase subunit Cks1 in human breast cancer. *Breast Cancer Res* 7, R737-744.

Soos, T. J., Kiyokawa, H., Yan, J. S., Rubin, M. S., Giordano, A., DeBlasio, A., Bottega, S., Wong, B., Mendelsohn, J., and Koff, A. (1996). Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ* 7, 135-146.

Soucek, T., Yeung, R. S., and Hengstschlager, M. (1998). Inactivation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 upon loss of the tuberous sclerosis complex gene-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15653-15658.

Spruck, C., Strohmaier, H., Watson, M., Smith, A. P., Ryan, A., Krek, T. W., and Reed, S. I. (2001). A CDK-independent function of mammalian Cks1: targeting of SCF(Skp2) to the CDK inhibitor p27Kip1. *Mol Cell* 7, 639-650.

Spruck, C. H., de Miguel, M. P., Smith, A. P., Ryan, A., Stein, P., Schultz, R. M., Lincoln, A. J., Donovan, P. J., and Reed, S. I. (2003). Requirement of Cks2 for the first metaphase/anaphase transition of mammalian meiosis. *Science* 300, 647-650.

Spruck, C. H., Won, K. A., and Reed, S. I. (1999). Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 401, 297-300.

Strohmaier, H., Spruck, C. H., Kaiser, P., Won, K. A., Sangfelt, O., and Reed, S. I. (2001). Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* 413, 316-322.

Suel, G. M., Lockless, S. W., Wall, M. A., and Ranganathan, R. (2003). Evolutionarily conserved networks of residues mediate allosteric communication in proteins. *Nat Struct Biol* 10, 59-69.

Swan, A., Barcelo, G., and Schupbach, T. (2005). *Drosophila* Cks30A interacts with Cdk1 to target Cyclin A for destruction in the female germline. *Development* 132, 3669-3678.

Tan, P., Cady, B., Wanner, M., Worland, P., Cukor, B., Magi-Galluzzi, C., Lavin, P., Draetta, G., Pagano, M., and Loda, M. (1997). The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57, 1259-1263.

Tang, Y., and Reed, S. I. (1993). The Cdk-associated protein Cks1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 7, 822-832.

Tedesco, D., Lukas, J., and Reed, S. I. (2002). The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev* 16, 2946-2957.

Tokumoto, T., Yamashita, M., Tokumoto, M., Katsu, Y., Horiguchi, R., Kajiura, H., and Nagahama, Y. (1997). Initiation of cyclin B degradation by the 26S proteasome upon egg activation. *J Cell Biol* 138, 1313-1322.

Tomoda, K., Kubota, Y., and Kato, J. (1999). Degradation of the cyclin-dependent-kinase inhibitor p27Kip1 is instigated by Jab1. *Nature* 398, 160-165.

Toyoshima, H., and Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78, 67-74.

Tsai, Y. S., Chang, H. C., Chuang, L. Y., and Hung, W. C. (2005). RNA silencing of Cks1 induced G2/M arrest and apoptosis in human lung cancer cells. *IUBMB Life* 57, 583-589.

Tsihlias, J., Kapusta, L. R., DeBoer, G., Morava-Protzner, I., Zbieranowski, I., Bhattacharya, N., Catzavelos, G. C., Klotz, L. H., and Slingerland, J. M. (1998). Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 58, 542-548.

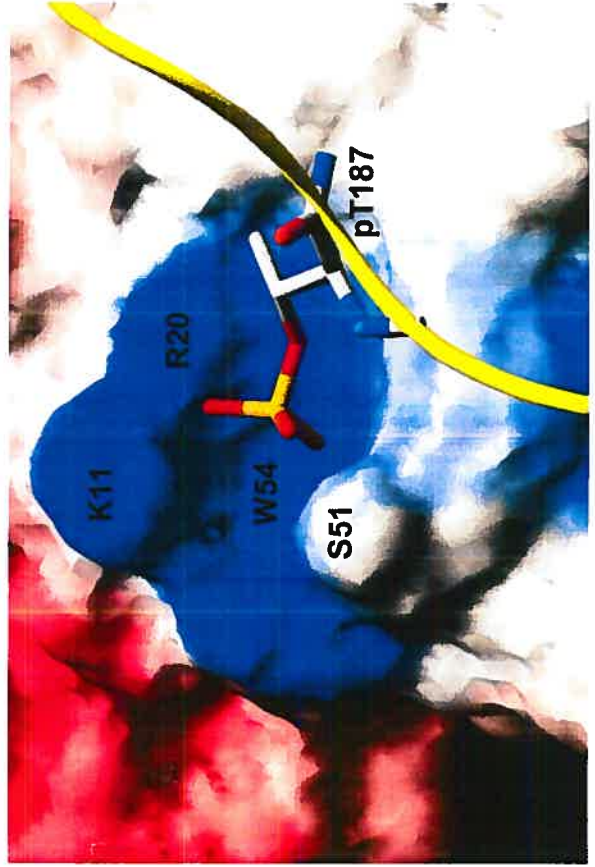
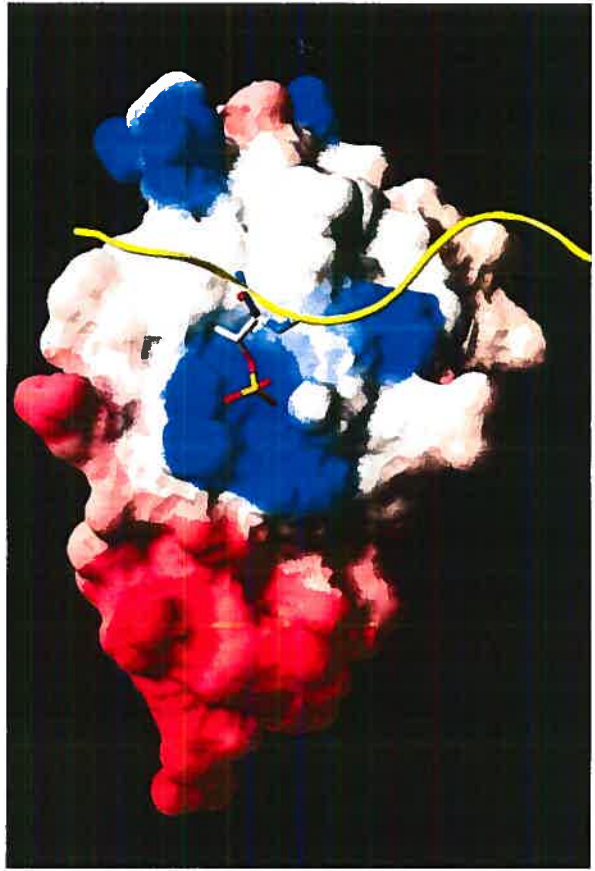
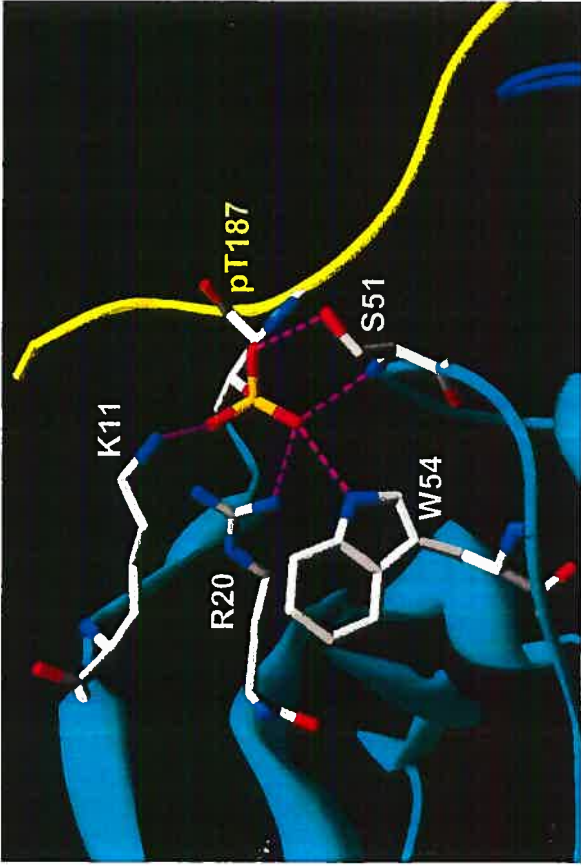
Turpaev, K., Bouton, C., Diet, A., Glatigny, A., and Drapier, J. C. (2005). Analysis of differentially expressed genes in nitric oxide-exposed human monocytic cells. *Free Radic Biol Med* 38, 1392-1400.

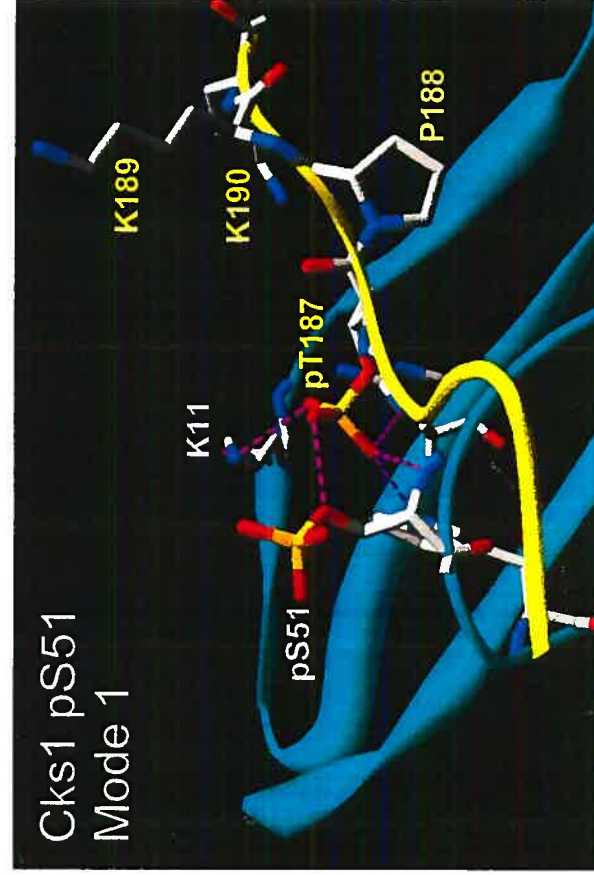
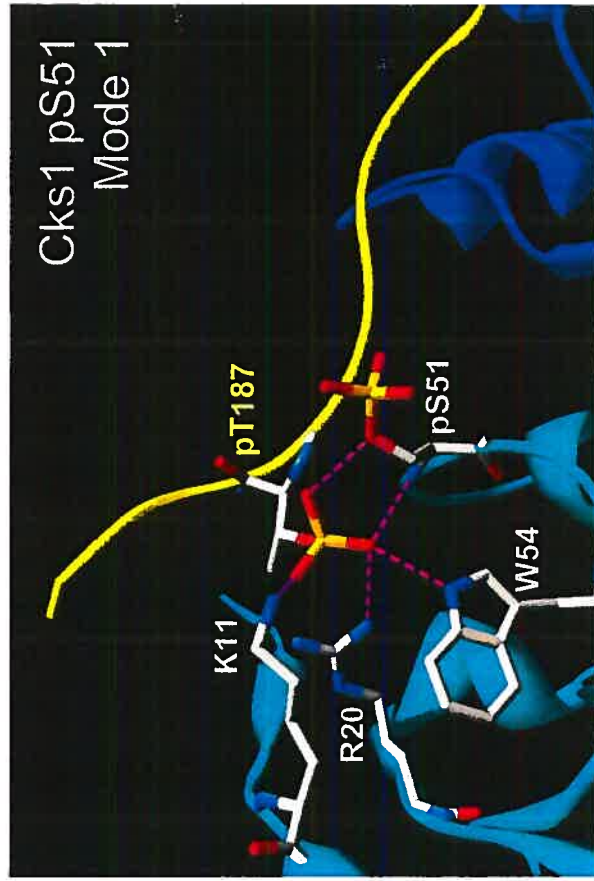
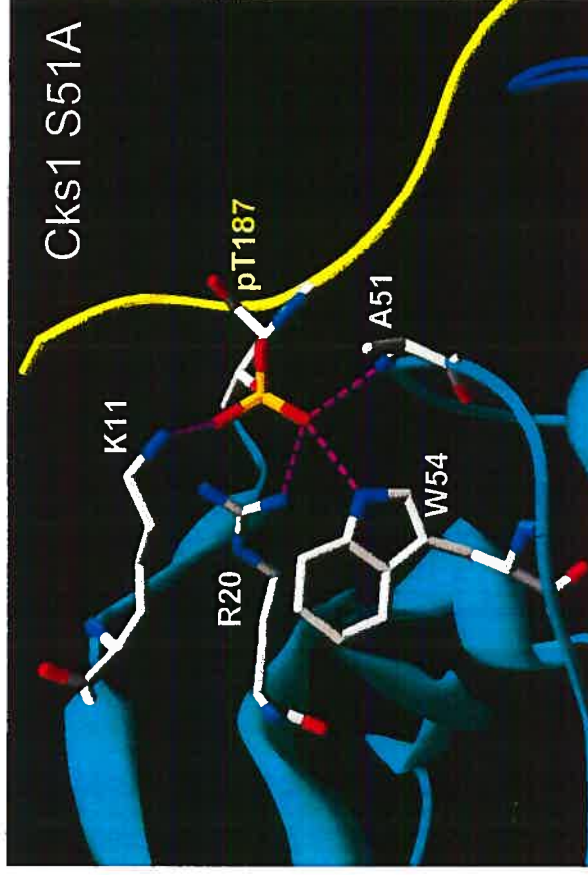
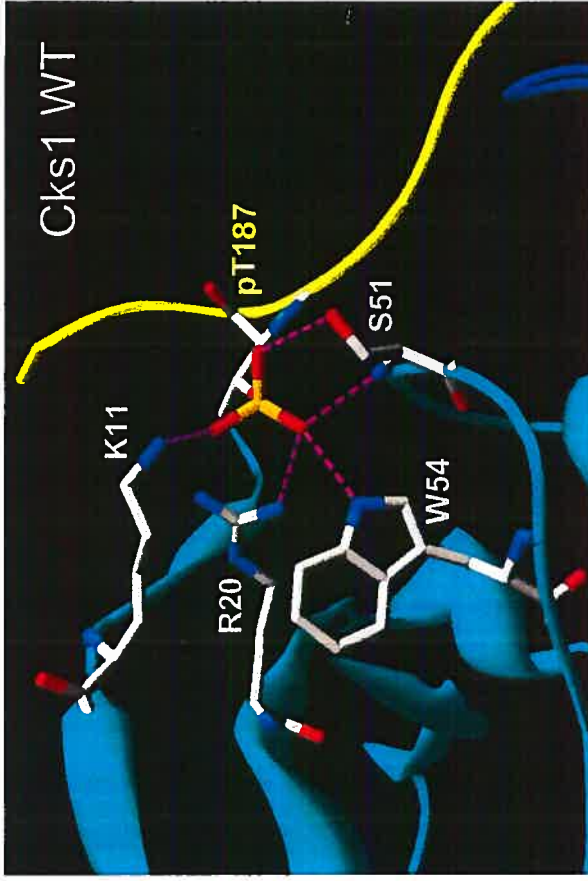
Ungermannova, D., Gao, Y., and Liu, X. (2005). Ubiquitination of p27Kip1 requires physical interaction with cyclin E and probable phosphate recognition by SKP2. *J Biol Chem* 280, 30301-30309.

- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., *et al.* (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844-848.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J., and Deshaies, R. J. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 118, 99-110.
- Vernell, R., Helin, K., and Muller, H. (2003). Identification of target genes of the p16INK4A-pRB-E2F pathway. *J Biol Chem* 278, 46124-46137.
- Vidal, A., and Koff, A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247, 1-15.
- Viglietto, G., Motti, M. L., and Fusco, A. (2002). Understanding p27(kip1) deregulation in cancer: down-regulation or mislocalization. *Cell Cycle* 1, 394-400.
- Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* 278, 460-463.
- Vlach, J., Hennecke, S., Alevizopoulos, K., Conti, D., and Amati, B. (1996). Growth arrest by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by c-Myc. *Embo J* 15, 6595-6604.
- Wang, I. C., Chen, Y. J., Hughes, D., Petrovic, V., Major, M. L., Park, H. J., Tan, Y., Ackerson, T., and Costa, R. H. (2005). Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 25, 10875-10894.
- Wang, W., Ungermannova, D., Chen, L., and Liu, X. (2003). A negatively charged amino acid in Skp2 is required for Skp2-Cks1 interaction and ubiquitination of p27Kip1. *J Biol Chem* 278, 32390-32396.
- Wang, W., Ungermannova, D., Chen, L., and Liu, X. (2004). Molecular and biochemical characterization of the Skp2-Cks1 binding interface. *J Biol Chem* 279, 51362-51369.
- Wirbelauer, C., Sutterluty, H., Blondel, M., Gstaiger, M., Peter, M., Reymond, F., and Krek, W. (2000). The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *Embo J* 19, 5362-5375.
- Won, K. A., and Reed, S. I. (1996). Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *Embo J* 15, 4182-4193.

- Wu, K., Chen, A., and Pan, Z. Q. (2000). Conjugation of Nedd8 to CUL1 enhances the ability of the ROC1-CUL1 complex to promote ubiquitin polymerization. *J Biol Chem* 275, 32317-32324.
- Xu, K., Belunis, C., Chu, W., Weber, D., Podlaski, F., Huang, K. S., Reed, S. I., and Vassilev, L. T. (2003). Protein-protein interactions involved in the recognition of p27 by E3 ubiquitin ligase. *Biochem J* 371, 957-964.
- Yam, C. H., Ng, R. W., Siu, W. Y., Lau, A. W., and Poon, R. Y. (1999). Regulation of cyclin A-Cdk2 by SCF component Skp1 and F-box protein Skp2. *Mol Cell Biol* 19, 635-645.
- Yang, H., Chen, Z. K., Zhang, X. H., Huang, X. W., Zhang, P. J., and Zhang, H. W. (2005). Identification and expression of the amphioxus Cks1 gene. *Cell Biol Int* 29, 593-597.
- Yasui, W., Kudo, Y., Semba, S., Yokozaki, H., and Tahara, E. (1997). Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 88, 625-629.
- Yu, V. P., Baskerville, C., Grunenfelder, B., and Reed, S. I. (2005). A kinase-independent function of Cks1 and Cdk1 in regulation of transcription. *Mol Cell* 17, 145-151.
- Zachariae, W., Shevchenko, A., Andrews, P. D., Ciosk, R., Galova, M., Stark, M. J., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* 279, 1216-1219.
- Zancai, P., Dal Col, J., Piccinin, S., Guidoboni, M., Cariati, R., Rizzo, S., Boiocchi, M., Maestro, R., and Dolcetti, R. (2005). Retinoic acid stabilizes p27Kip1 in EBV-immortalized lymphoblastoid B cell lines through enhanced proteasome-dependent degradation of the p45Skp2 and Cks1 proteins. *Oncogene* 24, 2483-2494.
- Zeng, Y., Hirano, K., Hirano, M., Nishimura, J., and Kanaide, H. (2000). Minimal requirements for the nuclear localization of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 37-42.
- Zhang, Y., Lin, Y., Bowles, C., and Wang, F. (2004). Direct cell cycle regulation by the fibroblast growth factor receptor (FGFR) kinase through phosphorylation-dependent release of Cks1 from FGFR substrate 2. *J Biol Chem* 279, 55348-55354.
- Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., *et al.* (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703-709.

7. ANNEXES – Modélisation de la phosphorylation de la sérine 51 sur Cks1 et de son impact négatif potentiel sur l'interaction de Cks1 avec p27 phosphorylé sur la thréonine 187.





D

