Régulation temporelle de l'abscission, la dernière étape de la division cellulaire : rôle des forces exercées au niveau du pont intercellulaire

Julie Janvore

▶ **To cite this version:**

Julie Janvore. Régulation temporelle de l'abscission, la dernière étape de la division cellulaire : rôle des forces exercées au niveau du pont intercellulaire. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112195 . tel-00819619

HAL Id: tel-00819619
https://theses.hal.science/tel-00819619

Submitted on 2 May 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

Spécialité Biologie Cellulaire
Ecole Doctorale Gènes, Génomes, Cellules

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 28 septembre 2012 par

Julie JANVORE

Régulation temporelle de l'abscission, la dernière étape de la division cellulaire : rôle des forces exercées au niveau du pont intercellulaire

Thèse dirigée par Matthieu PIEL

Composition du Jury :

Christian POÜS	Président du Jury
Claude PRIGENT	Rapporteur
Aurélien ROUX	Rapporteur
Daniel GERLICH	Examinateur
Arnaud ECHARD	Examinateur
Matthieu PIEL	Directeur de thèse

Unité Compartimentation et Dynamique cellulaires, Institut Curie / CNRS UMR144
26 rue d'Ulm 75248 Paris Cedex 05

pour toi lulu,

pour ton sourire inoubliable
et tout le bonheur que tu nous as apporté

Remerciements

Je voudrais remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse, et en particulier mes deux rapporteurs Claude Prigent et Aurélien Roux pour la lecture de mon mémoire pendant le mois d'août.

Je tiens ensuite à remercier chaleureusement Matthieu pour m'avoir accueillie dans son équipe et guidée tout au long de mon travail de thèse. J'ai beaucoup apprécié travailler au sein d'une équipe interdisciplinaire comme la tienne. En plus de la complémentarité des compétences et expertises de chacun, j'ai pu bénéficier de la richesse apportée par la façon dont les gens ont, en fonction de leur parcours, d'aborder les questions de biologie. Tu m'as appris à développer de nouvelles techniques lorsque cela était nécessaire, c'est-à-dire lorsqu'elles permettaient de répondre à une question biologique intéressante. A tes côtés, il devient naturel de penser que « tout est possible » : il suffit d'aller demander au bon collaborateur, et si la collaboration n'existe pas, il suffit de la mettre en place. J'ai également apprécié de pouvoir gérer mon temps et mon organisation avec liberté, sans jamais avoir été livrée à moi-même : ce ne sont pas les idées qui te manquent ! Merci pour tout.

Je voudrais également remercier Béatrice Satiat-Jeunemaître qui est à l'origine de mon intérêt pour l'Institut Curie. Lorsque je lui confiais, alors en Master 1, que c'était la biologie cellulaire qui m'intéressait le plus, de loin devant toutes les autres disciplines de la biologie, voici sa réponse : « ah ! si tu veux faire de la biologie cellulaire, c'est à l'Institut Curie qu'il faut aller ». En effet, je n'ai pas été déçue par l'environnement extraordinaire que constitue l'UMR 144 pour un biologiste cellulaire en herbe. Je remercie aussi Cécile Sykes à qui j'ai demandé à cette même époque de me mettre en relation avec la grande famille de l'Institut Curie : visite de son laboratoire dans l'UMR 168, et puisqu'elle avait bien compris que c'était la biologie cellulaire qui m'intéressait en particulier, elle m'a gentiment emmenée dans le laboratoire de Matthieu de l'autre côté de la rue. Je remercie également Michel Bornens qui a suivi de loin mon travail, mais avec un intérêt certain, et toujours plein d'encouragements.

Je voudrais remercier très chaleureusement les membres de l'équipe « Piel ». Manu, merci infiniment pour ton soutien quotidien ces trois dernières années au labo. Merci pour les repas du midi moins solitaires à ton arrivée, pour les pauses café (sans clope), les discussions innombrables, scientifiques, personnelles, simples bavardages ou parfois commérages. Tu es partout et tu aides tout le monde, et ensuite tu t'étonnes qu'on vienne te voir sans cesse dès qu'un microscope a un petit bobo ! Merci Franzi pour ta précieuse bonne humeur et tes conseils avisés. Merci Paolo ; en plus de notre collaboration fructueuse sur la fin de ma thèse, je peux te garantir que tu es le co-bureau le plus gentil de la terre ! Merci aussi à Nico C pour son aide sur certaines expériences, et surtout pour faire en sorte que le labo file bien droit. Enfin, merci également à tous les autres membres de l'équipe : Hawa, Alexis, Daria, Nico M, Maël, Mélanie, Ewa, et les membres passés Yanjun et Jenny. Merci à tous pour cette

atmosphère unique au labo, pour cet esprit de groupe, pour les nombreuses interactions professionnelles et personnelles, et pour cette bonne ambiance quotidienne. Thank you guys for supporting me as you did ! Et comme à nous tous nous parlons beaucoup de langues différentes, voici encore quelques mercis :

Merci beaucoup !
Thanks very much !
Grazie mille !
Danke schön !
Muchas gracias !
Jërëjëf !
Trugarez !

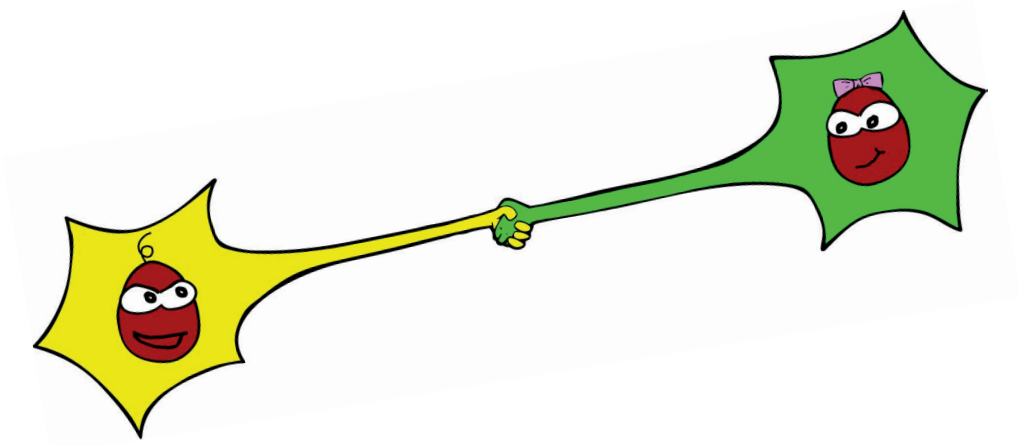
Un grand merci également à Charles Baroud pour les interactions fort sympathiques que nous avons eues, et aussi pour l'échange de bureau pendant la période de rédaction de ma thèse : ce fût presque un plaisir de rédiger dans un bureau calme et climatisé.

Je voudrais également remercier les collaborateurs du projet sans qui l'aspect interdisciplinaire de mon travail n'aurait pas été possible : Martial Balland et Irène Wang pour les expériences de Traction Force Microscopy, Mathieu Pinot et Jean-Baptiste Manneville pour les expériences de mesure de tension de membrane de cet été, et Timo Betz pour son expertise sur la modélisation biophysique du pont intercellulaire. Un grand merci également aux personnes de la plateforme d'imagerie de l'Institut Curie : Lucie, Vincent, François, Olivier et Olivier. Merci infiniment pour votre aide précieuse sur les microscopes, pour les analyses, les discussions scientifiques, macroscopiques, microscopiques, nanoscopiques, et enfin personnelles.

Merci également aux membres de l'équipe « Perez », mes très chers voisins de palier. En particulier, merci Ana pour toutes ces heures passées à travailler et discuter ensemble, avant notre projet commun et après. Merci d'avoir vu comme moi l'intérêt des petites vésicules CHMP4B-GFP qui fleurissaient dans mes films d'ablation, et merci d'avoir réalisé un si beau travail à partir de mon observation d'origine. Merci Hélène pour ton soutien sans faille tout au long de ma thèse, et merci Sandrine pour les conseils scientifiques et personnels lors des pauses café (sans clope), et pour la relecture minutieuse de mon introduction de thèse :)

Je voudrais remercier tout particulièrement mes amis et ma famille qui m'ont encouragée et soutenue pendant ces quatre longues années. Merci à Hadrien, Rosa, Olivier, Manu, Estelle, Félix et Vince. Merci aussi à toute ma famille, en particulier ma chère maman, mon frère et ma soeur. Merci à vous de m'avoir si souvent écoutée raconter la vie de mes petites cellules. Merci aussi à la famille Lafaurie, en particulier Catherine, Michel, Marion et Lucile. Vous aussi avez su m'écouter maintes et maintes fois parler de microtubules et de pont intercellulaire.

Finalement, je ne trouve pas de mots assez forts pour remercier la personne que je voudrais remercier le plus : Clément. Tu m'as toujours encouragée et soutenue, même dans les moments les plus difficiles. Tu as toujours cru en moi, que ce soit au début («le microscope a encore planté la nuit dernière, c'est la dixième fois... »), au milieu (« après un an de travail je ne comprends toujours rien au système, c'est fichu... »), ou à la fin (« j'ai fini mon plan de thèse, je ne pourrai jamais tout remplir, c'est impossible »). Tu ne t'es jamais lassé de m'écouter parler de mes cellules, des microscopes, des manipes, des collègues ou du chef. Tu ne m'as jamais reproché de passer tant et tant d'heures au labo, et tu es même venu m'y accompagner des soirées et des week-ends entiers pour me donner du courage. Tu m'as tellement aidé dans mon travail, la programmation, les macros, la mécanique, les schémas sur Illustrator et la maîtrise parfaite de Word. Tu comprends tout, même les ESCRT, et ça c'est pas facile ! Bref, MERCI.



Résumé

La dernière étape de la cytocinèse, l'abscission, consiste en la coupure du pont intercellulaire reliant les deux cellules filles à la suite de la contraction de l'anneau acto-myosique. Comme toutes les étapes de la division cellulaire, l'abscission doit être régulée dans l'espace et dans le temps afin qu'elle intervienne au bon endroit et au bon moment. Mon travail de doctorat a porté sur l'étude de la régulation dans le temps de l'abscission par l'environnement des cellules filles, en particulier par les forces de traction exercées par les cellules sur le pont intercellulaire. En utilisant une combinaison d'approches permettant de contrôler le confinement spatial 2D des cellules filles, de mesurer les forces exercées par les cellules au cours de la cytocinèse et de micro-manipuler le pont intercellulaire, j'ai montré que, de façon contre-intuitive, une tension exercée au niveau du pont retardait l'abscission et qu'au contraire la relâche de cette tension induisait l'abscission. De plus, la régulation temporelle de l'abscission par les facteurs environnementaux des cellules filles implique les protéines des « Endosomal Sorting Complex Required for Transport III » (ESCRT-III), machinerie centrale de l'abscission. Enfin, des expériences préliminaires suggèrent que cette régulation serait importante pour le maintien de l'intégrité tissulaire et la morphogenèse au cours du développement.

Mots-clés : cytocinèse, abscission, tension, microtubules, ESCRT-III

Abstract

The last step of cytokinesis, abscission, consists in the severing of the intercellular bridge connecting the two daughter cells after the contraction of the acto-myosin ring. As any other step of cell division, abscission has to be regulated both in time and space in order to take place at the proper time and proper place. During my PhD, I studied the temporal regulation of the abscission by the cell micro-environment, particularly by the traction forces exerted by the cells on the intercellular bridge. I used a combination of approaches to control the daughter cells 2D spatial confinement, to measure the forces exerted by the cells throughout cytokinesis, and to micro-manipulate the intercellular bridge. Counter-intuitively, a tension exerted on the intercellular bridge delayed abscission while a release of tension in the bridge induced abscission. Moreover, the temporal regulation of abscission by the environment of the daughter cells implies the Endosomal Sorting Complex Required for Transport III (ESCRT-III), the main abscission machinery. Finally, preliminary experiments suggest that this mechanism could be important for tissue integrity and morphogenesis.

Key words : cytokinesis, abscission, tension, microtubules, ESCRT-III

Table des matières

Remerciements 5
Résumé 9
Abstract....9
Table des matières 11
Liste des principales abréviations 15
Liste des figures et tables 16
Liste des films (DVD joint) et leurs légendes 19
Avant-propos....23
Introduction....25
I. Cycle cellulaire, checkpoints et cytocinèse 25
1. Le cycle cellulaire et son contrôle 25
a. Contrôle du cycle de division cellulaire par les kinases et phosphatases 25
b. La notion de point de contrôle.... 27
c. Le « Spindle Assembly Checkpoint ».... 28
d. Aurora B et la bi-orientation des kinétochores : un mécanisme de correction d'erreurs 30
2. La cytocinèse et sa machinerie moléculaire....32
a. Définition et introduction sur la cytocinèse.... 32
b. Différents mécanismes de cytocinèse 34
c. L'orchestration moléculaire de la cytocinèse.... 37
3. Polarité et cytocinèse 41
a. RhoA et Rac1.... 42
b. PIP2 et PIP3.... 42
c. Polarité en cytocinèse *versus* en migration.... 43
4. Adhésion et cytocinèse 44
a. Fibres de rétraction 45
b. Réétalement post-mitotique.... 46
c. Régulation de la cytocinèse par les adhésions 47
II. Le pont intercellulaire 49
1. D'un point de vue historique....49
2. Les constituants du pont....50
a. La membrane plasmique 51
b. L'actine 52
c. Les microtubules.... 54
d. Le midbody 55
e. Le trafic vésiculaire.... 57
f. Les ESCRT.... 59
g. Stabilité du pont intercellulaire.... 60
III. La coupure du pont intercellulaire : l'abscission 63

1. La coupure des microtubules 63
a. Les enzymes de coupure des microtubules 64
b. La Spastine : localisation en cytocinèse et régulation de son activité par la polyglutamylation 65
c. D'autres modes de coupure des microtubules lors de l'abscission 68
2. La fission de membrane 70
a. La Dynamine 71
b. Les ESCRT-III 73
c. Une remarque « topologique » 77
3. Les différents modèles d'abscission 78
a. Rupture par traction 78
b. Fusion massive de vésicules 81
c. Fission par les ESCRT-III 82
d. Modèle mixte Vésicules/ESCRT-III 85
4. La régulation dans le temps de l'abscission 86
a. Cytocinèse sans abscission 87
b. Le cas des ponts d'ADN : protection contre l'aneuploïdie par AuroraB 89
c. Coordination entre ingression du sillon et abscission grâce à Plk1 92
d. D'autres exemples de régulation dans le temps moins bien compris 93
IV. De la mécanique dans la biologie cellulaire 95
1. Mécano-sensibilité et mécano-transduction : généralités 95
a. Définition 95
b. Exemples de mécanotransduction 96
2. Machineries cellulaires impliquées dans la mécanotransduction 98
a. Réponse à la rigidité du substrat 98
b. Réponse à la géométrie des adhésions cellule-substrat 101
c. Rôles de la tension de membrane 104
3. Forces et cytocinèse 105
Objectifs 109
Développements méthodologiques 111
I. Etude dynamique de la cytocinèse et de l'abscission 111
1. Comment observer l'abscission ? 111
2. Vidéomicroscopie et cytocinèse 112
II. Etude de la cytocinèse au moyen de micro-motifs adhésifs 115
1. La technique des micro-motifs adhésifs 115
2. Stabilisation du pont intercellulaire 116
3. Contrôle de différents paramètres cellulaires au cours de la cytocinèse 121
III. Micromanipulation 122
1. Système d'étirement cellulaire 123
2. Micro-ablation par laser 125
3. Système de double pipette 126
IV. Mesures de forces au cours de la division cellulaire 127

1. Microscopie à force atomique 127
2. « Traction Force Microscopy » 129
3. Utilisation de micro-piliers 133

Résultats 135

I. Régulation temporelle de l'abscission par la tension dans le pont intercellulaire : induction de l'assemblage des ESCRT-III et de l'abscission par relâche de tension dans le pont 135

1. Résumé 135
2. Article en cours de publication 137
3. Remarque 179

II. Une découverte inattendue : les ESCRT impliqués dans la réparation membranaire 181

1. Une observation fortuite 181
2. La réparation membranaire 182
3. Un projet à part entière 184

Discussion 187

I. Mécanismes potentiels de la régulation dans le temps de l'abscission par le comportement des cellules filles 187

1. Maturation du pont intercellulaire 187
2. Structure des microtubules du pont 188
3. CHMP4C et AuroraB 191
4. Tension de membrane 193
5. Mécanotransduction *via* RhoA 195
6. Sur quoi la tension dans le pont est-elle exercée ? 196

II. Quelques hypothèses sur la fonction de la régulation dans le temps de l'abscission par la tension dans le pont 198

1. Coordination entre abscission et réétalement des cellules filles 198
2. Rétablissement des cellules filles au sein de leur micro-environnement et intégrité tissulaire 200
3. Formation des jonctions cellule-cellule entre cellules filles 203
4. Morphogenèse embryonnaire 206
5. Comment étudier la fonction de cette régulation ? 210

III. Mise en perspective 211

1. Des résultats contre-intuitifs 211
2. Point de rencontre de deux modèles d'abscission 212
3. Les ESCRT au cœur de la régulation temporelle de l'abscission 214

Conclusion générale 217

Références 219

Annexes 233

I. Protocoles détaillés 233

1. Vidéomicroscopie de la division cellulaire 233
2. Transfection (plasmides) et vidéomicroscopie 236
3. Transfection (siRNA) et vidéomicroscopie 238
4. Fabrication de lignées stables fluorescentes 240
5. Synchronisation par mitotic-shake-off 243
6. Fabrication des micro-motifs adhésifs sur verre par la méthode des UV et utilisation en vidéomicroscopie 244
7. Traction Force Microscopy au cours de la cytocinèse 247

II. Plans des masques optiques conçus 250

1. Masque 1 250
2. Masque 2 251
3. Masque 3 252
4. Masque 4 253

III. Autres articles publiés au cours de la thèse 254

Liste des principales abréviations

AFM	Atomic Force Microscopy
Alix	ALG-2- interacting protein X
APC	Anaphase Promoting Complex
Arp2/3	Actin related protein 2/3
Cdc42	Cell division cycle 42
Cdk	Cyclin-dependent kinase
Cep55	Centrosomal protein of 55 kDa
CHMP	Charged Multivesicular Body Protein
CPC	Chromosomal Passenger Complex
DIC	Differential Interference Contrast microscopy
EB1	End-Binding protein 1
ECT2	Epithelial cell transforming sequence 2
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAP	GTPase Activating Protein
GDI	Guanine-nucleotide Dissociation Inhibitor
GEF	Guanine-nucleotide Exchange Factor
KMN	réseau KNL1-Mis12-Ndc80
MAP	Microtubule-Associated Protein
MKLP1	Mitotic kinesin-like protein 1
PA-GFP	Photoactivable Green Fluorescent Protein
PDMS	Polydiméthylsiloxane
PEG	Polyéthylène glycol
PI3K	Phosphatidyl-Inositol(4,5)P2-3kinase
PIP2	Phosphatidyl-Inositol(4,5)P2
PIP3	Phosphatidyl-Inositol(3,4,5)P3
Plk	Polo-like kinase 1
PRC1	Protein Regulating Cytokinesis 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Rac1	Ras related C3 botulinum toxin substrate
RhoA	Ras homologue A
ROCK	p160-Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase ou Rho-Kinase
SAC	Spindle Assembly Checkpoint
siRNA	small interfering RNA
TFM	Traction Force Microscopy
Tsp101	Tumor susceptibility gene 101
UV	Ultraviolet
Vps4	Vacuolar protein sorting 4

Liste des figures et tables

Figure 1 : Contrôle du cycle cellulaire par les « cyclin-dependent kinases » ou Cdk.....26
Figure 2 : Structure schématique du kinétochore. 29
Figure 3 : Le réseau KMN, interface entre le kinétochore et le microtubule.....31
Figure 4 : Régulation de l'attachement des kinétochores par AuroraB.....32
Figure 5 : Cycle cellulaire et défauts de cytocinèse physiologiques ou pathologiques 34
Figure 6 : Mécanismes de cytocinèse chez les plantes, les levures fissipares et les cellules animales .36
Figure 7 : Défauts de cytocinèse plus ou moins tardifs 37
Figure 8 : Régulation des Rho GTPases et définition du plan de clivage en cytocinèse 40
Figure 9 : Deux voies de régulation de la formation de l'anneau contractile 41
Figure 10 : Comparaison de la polarité en cytocinèse et en migration 43
Figure 11 : Evolution de la polarité au cours du cycle cellulaire 44
Figure 12 : Fibres de rétraction en mitose 45
Figure 13 : Réétalement des cellules filles sur l'empreinte de la cellule mère 47
Figure 14 : Localisation de l'intégrine-β1 et Rab21 en cytocinèse 48
Figure 15 : La cytocinèse vue par Byers et Abramson en 1968 50
Figure 16 : Ultrastructure du pont intercellulaire 51
Figure 17 : Modèle de la structure des microtubules dans le pont intercellulaire 54
Figure 18 : Représentation schématique du trafic vésiculaire lors de la cytocinèse.....59
Figure 19 : Stabilisation du pont intercellulaire et du midbody 61
Figure 20 : Structure et mode d'action de la Spastine.....65
Figure 21 : Modèle pour le recrutement de la Spastine au midbody.....66
Figure 22 : Modifications post-traductionnelles des microtubules.....67
Figure 23 : Localisation des polyglutamylations en chaîne longue pendant la division cellulaire 68
Figure 24 : Mécanismes potentiels de cassure des microtubules courbés.....69
Figure 25 : Organisation des microtubules en cytocinèse précoce et tardive 70
Figure 26 : Modèle de la torsion de la Dynamine.....72
Figure 27 : Rôle de la tension sur la fission membranaire 73
Figure 28 : Diversité des processus cellulaires impliquant les ESCRT.....74
Figure 29 : Les ESCRT-III *in vivo* 76
Figure 30 : Les ESCRT-III *in vitro*.....77
Figure 31 : Topologie inversée des événements de fission impliquant la Dynamine ou les ESCRT-III ..78
Figure 32 : Quatre modes de cytocinèse chez *Dictyostelium discoideum* 80
Figure 33 : Modèle d'abscission par fusion de vésicules 81
Figure 34 : Zone de constriction du pont au site d'abscission 83
Figure 35 : Modèle d'abscission par les ESCRT-III – Guizetti et coll., 2011 84
Figure 36 : Modèle d'abscission par les ESCRT-III – Elia et al., 2011.....85
Figure 37 : Modèle mixte d'abscission (fusion de vésicules et fission par les ESCRT-III).....86
Figure 38 : Modèle de l'inhibition de l'abscission par TEX14 lors de la spermatogenèse 88
Figure 39 : Ponts cytoplasmiques dans le follicule de Drosophile.....89
Figure 40 : Modèle de l'inhibition de l'abscission par la présence d'ADN dans le pont intercellulaire.90
Figure 41 : Modèle de l'inhibition de l'abscission *via* AuroraB et CHMP4C en cas de pont d'ADN 91

Figure 42 : Modèle de la régulation dans le temps de l'abscission par Plk1 93
Figure 43 : Deux exemples de changement de partenaire au cours de la cytocinèse 94
Figure 44 : Différenciation des MSCs en fonction de la rigidité du substrat de culture 97
Figure 45 : Effets de la rigidité du substrat sur l'organisation cellulaire 100
Figure 46 : Réponse des cellules soumises à un étirement 100
Figure 47 : Augmentation de la contractilité cellulaire avec la surface d'étalement 101
Figure 48 : Effet de la géométrie des adhésions au substrat sur l'architecture et la contractilité cellulaires 102
Figure 49 : YAP/TAZ est localisé au noyau ou au cytoplasme en fonction de l'environnement extracellulaire 104
Figure 50 : Etude de la cytocinèse au moyen de l'AFM 106
Figure 51 : Forces de traction lors du réétalement post-mitotique des cellules filles 107
Figure 52 : Méthode de détermination de l'abscission par utilisation de la PA-GFP 112
Figure 53 : Etude de la division cellulaire en vidéomicroscopie 114
Figure 54 : Méthode de fabrication des micro-motifs adhésifs par illumination aux UV 116
Figure 55: Double motifs pour l'étude de la cytocinèse 117
Figure 56 : Position du pont intercellulaire en fonction du micro-motif adhésif 118
Figure 57 : Optimisation des micro-motifs adhésifs pour l'observation de la cytocinèse 119
Figure 58 : Représentations sous forme de planche et de kymographe des films de vidéomicroscopie 121
Figure 59 : Paramètres cellulaires contrôlés grâce aux micro-motifs adhésifs 122
Figure 60 : Principe du système d'étirement cellulaire 123
Figure 61 : Expérience préliminaire de compression du pont en utilisant un substrat étirable 125
Figure 62 : Système de double pipette 126
Figure 63 : Microscopie à force atomique et mesure de rigidité de l'échantillon 127
Figure 64 : Mesures de rigidité par microscopie à force atomique sur cellules en cytocinèse 128
Figure 65 : Traction Force Microscopy 130
Figure 66 : Variantes de la Traction Force Microscopy (TFM) 132
Figure 67 : Utilisation de micro-piliers pour la mesure des forces exercées par les cellules 133
Figure 68 : Cellules filles sur substrat de micro-piliers flexibles 134
Figure 69 : Recrutement de vésicules CHMP4B-GFP positives suite à un endommagement cellulaire 182
Figure 70 : Modèle de réparation par "patch" vésiculaire 184
Figure 71 : Observation dynamique et quantitative de la réparation membranaire et microscopie corrélative 186
Figure 72 : Dynamique des microtubules du pont intercellulaire 189
Figure 73 : Modèle de l'organisation des microtubules du pont 190
Figure 74 : Suivi de l'organisation des microtubules lors des expériences d'ablation 191
Figure 75 : Localisation de CHMP4C et AuroraB au midbody 193
Figure 76 : Structure en dôme des ESCRT-III lors de la fission de membrane 194
Figure 77 : Ablation des microtubules du pont au moyen d'un laser 2-photon 197
Figure 78 : Relation entre tension dans le pont et étalement des cellules filles 199
Figure 79 : Cytocinèse et abscission de cellules non-adhérentes 200
Figure 80 : Evolution de la tension dans le pont au cours de la formation des jonctions cellule-cellule 201

Figure 81 : Division cellulaire au sein d'un épithélium sous tension 202
Figure 82 : Régulation temporelle de l'abscission participant à l'intégrité d'un épithélium 203
Figure 83 : Présence de filopodes autour du pont intercellulaire 204
Figure 84 : Formation des jonctions cellule-cellule 206
Figure 85 : Présence de ponts intercellulaires dans l'embryon du poisson zèbre 208
Figure 86 : Division en symétrie miroir lors de la morphogenèse du tube neural 209
Figure 87 : Expériences d'ablation et de micromanipulation du pont.....210
Figure 88: Evolution de l'intensité de fluorescence des microtubules du pont pour les modes A et B 214

Table 1 : Machinerie des ESCRT-III.....75
Table 2 : Situations équivalentes en terme de réponse cellulaire.....102
Table 3 : Localisation de YAP/TAZ en fonction de l'environnement cellulaire.....103

Liste des films (DVD joint) et leurs légendes

Films présentés dans la thèse :

Film 1 : Kyoto-H2B-tub_Fibro. Vidéomicroscopie de la lignée stable HeLa Kyoto α-tubuline-EGFP (vert) histone2B-mCherry (rouge) cultivée sur verre traité à la fibronectine. Acquisition au 20x NA 0,75 binning 1, une image toutes les 4 minutes.

Film 2 : Migration_Ligne_Interphase. Migration sur ligne de 9 µm de largueur d'une cellule en interphase. Images de la lumière transmise (en haut), deα -tubuline-EGFP (milieu), et de histone2B-mCherry (bas). Acquisition au 10x NA 0,45 binning 1, une image toutes les 4 minutes, échelle 20 µm.

Film 3 : Migration_Ligne_Cytocinese. Migration sur ligne de 9 µm de largueur de cellules en sortie de mitose. Images de la lumière transmise (en haut), de α-tubuline-EGFP (milieu), et de histone2B-mCherry (bas). Acquisition au 10x NA 0,45 binning1, une image toutes les 4 minutes, échelle 20 µm.

Film 4 : Micro-Motifs-Cytocinese_1. Etude de la cytocinèse au moyen de micro-motifs adhésifs comportant deux parties. Observation de 6 cellules sur le même champ de vision. Images de la lumière transmise, de α-tubuline-EGFP, de histone2B-mCherry, et la combinaison de couleurs représente les microtubules (vert) et l'ADN (rouge).

Film 5 : Micro-Motifs-Cytocinese_2. Stabilisation de la position des cellules filles et du pont intercellulaire grâce à l'utilisation d'un micro-motif adhésif adapté. On observe l'étalement de la cellule mère, la division, l'entrée en cytocinèse et finalement l'abscission. A gauche, les cellules filles restent bien stables chacune sur leur partie, à droite les cellules se rapprochent lors d'un « kiss » induisant l'abscission. En bleu image du motif fluorescent au début du film, en vert les microtubules, en rouge l'ADN. Une image toutes les 4 minutes pendant 20 heures.

Film 6 : Micro-Motifs-Cytocinese_3. Contrôle du confinement spatial 2D des cellules filles. Montage de plusieurs cellules cultivées sur des disques de 60 µm de diamètre. Imagerie de la α-tubuline-EGFP, une image toutes les 4 minutes.

Film 7 : Etirement_cyclique. Expérience d'étirement cellulaire cyclique au cours de la cytocinèse. Images de la lumière transmise et de la α-tubuline-EGFP.

Film 8 : Abation2ph_Membrane-intacte. Ablation au moyen d'un laser 2-photons : coupure des microtubules du pont intercellulaire, mais membrane intacte. Images de la lumière transmise et de la α-tubuline-EGFP. Temps indiqué en secondes après ablation.

Film 9 : Abation2ph_Avant-Apres. Ablation au moyen d'un laser 2-photons : images Avant et Après ablation pour observer le mouvement des cellules suite à l'ablation.

Film 10 : Abation2ph_MTs. Ablation au moyen d'un laser 2-photons : repousse des microtubules dans le tube de membrane resté intact après l'ablation. Observation de la α-tubuline-EGFP. Temps indiqué en minutes et secondes après ablation.

Film 11 : Micro-piliers. Mouvement des micro-piliers de PDMS sous l'action des forces exercées par les cellules en cytocinèse. Une image toutes les 15 secondes pendant 5 minutes, échelle de temps notée en minutes (3.50 minutes correspond à 3 minutes et 30 secondes).

Film 12 : ReparationMb_CHMP4B-GFP. Recrutement de CHMP4B-GFP suite à un endommagement de la membrane plasmique par ablation laser. Echelle 10 µm, temps indiqué en minutes et secondes après ablation.

Film 13 : EB3_Prometaphase. Dynamique de EB3-GFP (protéine des bouts « plus » des microtubules) lors de la prométaphase (séparation des centrosomes). Lignée stable HeLa sélectionnée pour son faible taux d'expression de EB3-GFP afin d'éviter de perturber la dynamique des microtubules. Une image toutes les secondes pendant 30 secondes.

Film 14 : EB3_Metaphase. Dynamique de EB3-GFP lors de la métaphase. On observe en particulier les extrémités des microtubules astraux. Mêmes conditions d'acquisition que le Film 13.

Film 15 : EB3_Anaphase. Dynamique de EB3-GFP lors de l'anaphase. Mêmes conditions d'acquisition que le Film 13.

Film 16 : EB3_Cytocinese_precoce. Dynamique de EB3-GFP en début de cytocinèse. On observe clairement deux bandes sur les côtés du midbody. Mêmes conditions d'acquisition que le Film 13.

Film 17 : EB3_Cytocinese_milieu. Dynamique de EB3-GFP en cours de cytocinèse (même cellule que le Film 16). On observe maintenant deux petits cônes de part et d'autre du midbody. Mêmes conditions d'acquisition que le Film 13.

Film 18 : EB3_Cytocinese_tardif. Dynamique de EB3-GFP en cytocinèse tardive, le pont est particulièrement long et les microtubules sont moins bien organisés qu'au début de la cytocinèse (même cellule que les films 16 et 17). Mêmes conditions d'acquisition que le Film 13.

Film 19 : FRAP_precoce. Expérience de FRAP de la α-tubuline-EGFP lors de la cytocinèse précoce. On observe la récupération de fluorescence en une petite bande sur le côté du midbody.

Film 20 : FRAP_tardif. Expérience de FRAP de la α-tubuline-EGFP lors de la cytocinèse tardive. La zone de récupération de la fluorescence est moins bien délimitée, signe que les microtubules sont moins bien organisés dans le pont qu'en début de cytocinèse.

Film 21 : Mitotic-shake_PEG_MyrPalm. Comportement des cellules filles lors d'une cytocinèse non adhérente. Les cellules en division sont récupérées par mitotic shake-off, déposée sur une surface répulsive (traitée à la poly-lysine-PEG) et suivie en vidéomicroscopie. Cette lignée stable permet l'observation de la membrane plasmique (MyrPalm-EGFP, vert) et de l'ADN (histone2B-mCherry, rouge). Temps indiqué en minute après début du film. On observe la formation d'une forte adhésion entre les cellules filles.

Film 22 : Mitotic-shake_PEG_Tubuline. Mêmes conditions d'expérience que le Film 21, mais observation de la α-tubulin-EGFP (lignée histone2B-mCherry et α-tubuline-EGFP). On observe à la fin du film le midbody flottant entre les deux cellules filles après la coupure du pont.

Films présentés dans l'article :

Movie S1 : Glass-Fibro. Vidéomicroscopie de cellules HeLa Kyoto exprimant la α-tubuline-EGFP cultivées sur différents substrats à différentes densités cellulaires. Temps indiqué en minutes, échelle 10 µm.

Movie S2 : Disks. Vidéomicroscopie de cellules HeLa Kyoto α-tubuline-EGFP (vert) et histone2B-mCherry (rouge) cultivées sur des micro-motifs en forme de disques de différentes tailles. Temps indiqué en minutes, 0 min à l'anaphase, échelle 10 µm.

Movie S3 : TFM-fluo. Acquisition en vidéomicroscopie pour les expériences de « Traction Force Microscopy ». Pour chaque cellule, un film comportant une image toutes les 4 minutes est enregistré depuis la métaphase jusqu'à l'abscission. Les images en contraste de phase (en haut à gauche) et les images des billes fluorescentes (en haut à droite) sont enregistrées à chaque point de temps, les images de la α-tubuline-EGFP (en bas à gauche) tous les deux points de temps, et les images de la histone2B-mCherry (en bas à droite) tous les 5 points de temps. A la fin du film, les cellules sont détachées afin d'enregistrer une image du gel sans contrainte. Temps indiqué en minutes, 0 min à l'anaphase, échelle 10 µm.

Movie S4 : TFM-forces. Résultat de l'analyse des acquisitions en TFM : pour chaque point de temps, le champ de forces (flèches rouges) est superposé à l'image de contraste de phase des cellules. Temps indiqué en minutes, 0 min à l'anaphase, échelle 10 µm.

Movie S5 : Modes-20x. Trois modes d'abscission observés à faible grossissement. Images de la α-tubuline-EGFP et du contraste de phase. Temps indiqué en minutes, 0 min à l'anaphase, échelle 10 µm.

Movie S6 : Modes-60x. Trois modes d'abscission observés à fort grossissement. Images de la α-tubuline-EGFP. Temps indiqué en minutes, 0 min à l'anaphase, échelle 10 µm.

Movie S7 : Abla-Release-tension. Relâche artificielle de tension dans le pont intercellulaire par ablation laser. Temps indiqué en sec.ms, 00.000 lors de l'ablation, échelle 10 µm.

Movie S8 : AblaWT. Expériences d'ablation laser au niveau du pont (« bridge ablation ») ou au niveau des lamellipodes (« control ablation »). Images de la α-tubuline-EGFP. Temps indiqué en minutes, 0 min à l'ablation, échelle 5 µm.

Movie S9 : AblaSiRNA. Expériences d'ablation sur des cellules traitées par un siRNA Contrôle, un siRNA Spastine, ou un siRNA CHMP2A. Images de la α-tubuline-EGFP. Temps indiqué en minutes, 0 min à l'ablation, échelle 5 µm.

Movie S10 : CHMP4B-GFPmodeA. Vidéomicroscopie de cellules HeLa Kyoto CHMP4B-GFP (vert) et α-tubuline-RFP (rouge) cultivées sur substrat traité à la fibronectine. Temps indiqué en minutes, 0 min à l'anaphase, échelle 5 µm.

Movie S11 : AblaCHMP4B-GFP. Expériences d'ablation sur les cellules CHMP4B-GFP (vert) et α-tubuline-RFP (rouge), en cytocinèse tardive (CHMP4B déjà recruté au midbody), et en cytocinèse précoce (CHMP4B pas encore recruté au midbody). Chaque film est suivi d'un zoom sur le pont. Temps indiqué en minutes, 0 min à l'ablation, échelle 5 µm.

Avant-propos

Ce mémoire de thèse présente les travaux de recherche réalisés dans le cadre de mon doctorat sous la direction de Matthieu Piel au sein de l'UMR 144 de l'Institut Curie. J'y aborde le contexte dans lequel s'inscrit ces travaux, leurs résultats, ainsi que les perspectives qu'ils apportent au domaine de l'étude de la division cellulaire. Mon projet a porté sur l'étude de la régulation temporelle de l'abscission, la dernière étape de la division cellulaire. En particulier, le rôle des forces exercées au niveau du pont intercellulaire reliant les deux cellules filles lors de la cytocinèse a été abordé au moyen d'approches originales et interdisciplinaires.

Dans l'introduction, je commencerai par présenter certaines notions concernant la régulation du cycle cellulaire, notamment la notion de « checkpoints ». Ensuite, je développerai les principaux mécanismes moléculaires de la cytocinèse, puis j'aborderai en détail la formation du pont intercellulaire, sa composition, sa stabilisation, et finalement sa coupure lors de l'abscission. La dernière partie de l'introduction sera consacrée à la notion de mécanotransduction, ou comment les cellules ressentent et réagissent à des forces extérieures.

Par la suite, je présenterai les approches méthodologiques qui ont été développées au cours de mes travaux afin de répondre à la problématique posée. En particulier, je détaillerai comment certaines techniques spécifiques ont été adaptées à l'étude de la cytocinèse et de l'abscission : suivi en vidéomicroscopie du déroulement de la cytocinèse, contrôle du confinement spatial des cellules filles, mesure des forces exercées par les cellules au cours de la cytocinèse, et modulation artificielle de la tension au niveau du pont intercellulaire.

Dans la partie dédiée aux résultats, je présenterai l'ensemble de mes résultats concernant la régulation temporelle de l'abscission par l'environnement des cellules filles sous forme d'un manuscrit d'article destiné à la publication. J'ajouterai une courte partie retraçant la naissance d'un projet de recherche annexe à partir d'une observation fortuite réalisée au cours de mes expériences sur l'étude de l'abscission. Notamment, je montrerai comment les complexes protéiques des ESCRT peuvent « faire le pont » entre deux thématiques très différentes de la biologie cellulaire : la cytocinèse et la réparation membranaire.

Finalement, dans une discussion approfondie des résultats présentés dans l'article, je présenterai des pistes de réflexion sur le mécanisme moléculaire de la régulation temporelle de l'abscission par la tension dans le pont intercellulaire. J'aborderai ensuite plusieurs hypothèses sur la fonction de cette régulation, à la fois au niveau cellulaire et tissulaire, et je terminerai par une mise en perspective de mes résultats.

Introduction

I. Cycle cellulaire, checkpoints et cytocinèse

1. Le cycle cellulaire et son contrôle

a. Contrôle du cycle de division cellulaire par les kinases et phosphatases

Une cellule en prolifération suit un cycle de division précis où différentes phases se succèdent de façon bien contrôlée. La Figure 1A illustre ces différentes phases du cycle : la phase G1 où la cellule croît, la phase S où l'ADN est répliqué, la phase G2 où la cellule continue de croître jusqu'à l'entrée en mitose ou phase M. En fin de mitose, la cytocinèse sépare les deux cellules filles, et celles-ci entrent dans un nouveau cycle cellulaire en phase G1. Au cours de cette succession d'étapes, trois transitions majeures sont critiques et extrêmement contrôlées par la cellule : il s'agit des transitions G1-S, G2-M, et métaphase-anaphase (en gras dans la figure). Au niveau de ces transitions, des points de contrôle du cycle cellulaire vérifient que les étapes précédentes du cycle se sont correctement déroulées ; ces points de contrôle sont décrits dans le paragraphe suivant.

L'enchaînement des différentes phases du cycle est régulé par les « cyclin-dependent kinases » (ou Cdk) et des phosphatases spécifiques qui contre-balancent ces kinases. Les Cdk sont des kinases constitutivement présentes dans les cellules dont l'activité est dépendante de l'association d'une protéine activatrice, une cycline. Les cyclines sont des protéines régulatrices dont l'expression varie au cours du cycle cellulaire, modulant ainsi l'activité des Cdk. Il existe plusieurs Cdk et plusieurs cyclines, et les différentes phases du cycle sont régulées par différents complexes Cdk-cycline. Il est communément admis (même si certaines subtilités compliquent le modèle), que les différentes phases du cycle sont déclenchées lorsque le niveau de complexe Cdk-cycline correspondant atteint un seuil critique. La dégradation de la cycline permet ensuite une diminution de l'activité de la Cdk et un retour à un état de base. La Figure 1B illustre le niveau des différents complexes Cdk-cycline en fonction du cycle cellulaire, ainsi :

- Cdk2-cyclineE déclenche la phase S
- Cdk1-cyclineA et la Cdk2-cyclineA prolongent la phase S
- Cdk1-cyclineB déclenche l'entrée en mitose

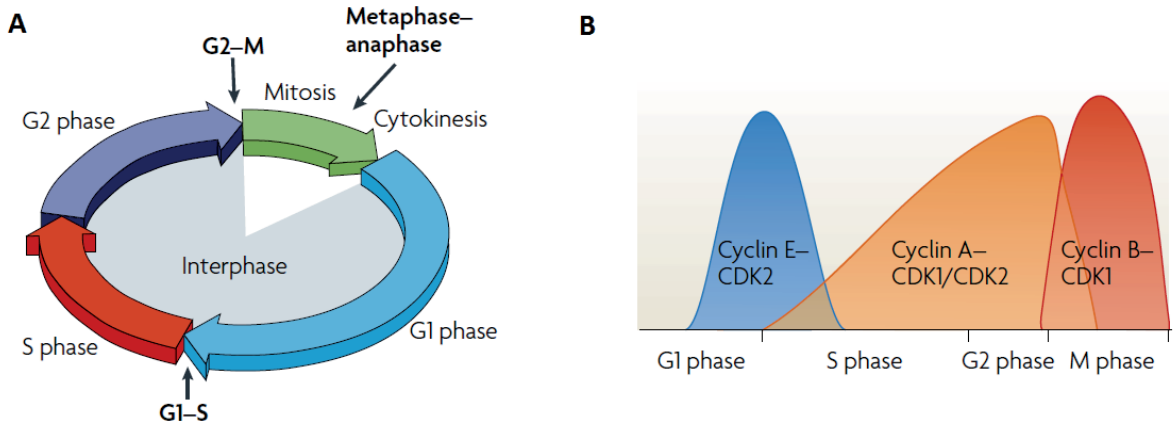


Figure 1 : Contrôle du cycle cellulaire par les « cyclin-dependent kinases » ou Cdk.
A) Succession des différentes phases du cycle cellulaire et leurs points de contrôle (en gras). B) Niveau des différents complexes Cdk-cycline au cours du cycle cellulaire. Adapté de (Hochegger et al., 2008).

J'ai choisi de détailler ici uniquement l'**entrée en mitose**, soit la transition G2-M. Lors de l'entrée en mitose, l'**activation de Cdk1 par la cyclineB** induit de profonds changements dans la cellule, à la fois au niveau morphologique et au niveau des voies de signalisation internes, qui perdurent pendant toute la durée de la mitose. La sortie de mitose et la cytocinèse sont ensuite provoquées par la **dégradation de la cyclineB qui inactive Cdk1**. Pour une revue, voir (F. A. Barr et al., 2011).

Lors de la phase G2, la cellule synthétise de plus en plus de cyclineB jusqu'à ce que le complexe Cdk1-cyclineB atteigne un seuil qui déclenche l'entrée en mitose. Cette association en hétérodimère de Cdk1 et de la cyclineB porte le nom de MPF ou Mitosis Promoting Factor. En parallèle, il y a également inhibition de la phosphatase PP2A antagoniste de Cdk1, PP2A déphosphorylant les substrats de Cdk1. De plus, la phosphatase Cdc25 (cell division cycle 25) enlève les phosphorylations inhibitrices dues à Wee1 sur Cdk1. L'activation de Cdk1-cyclineB va conduire à une réorganisation dramatique de l'architecture cellulaire : condensation des chromosomes, désassemblage de l'enveloppe nucléaire, formation du fuseau mitotique et désassemblage de l'appareil de Golgi. Ces réarrangements sont obtenus grâce à la phosphorylation de nombreux substrats par Cdk1 : lamines nucléaires, kinésines, protéines associées aux microtubules, composants de la matrice du Golgi, etc. Le complexe Cdk1-cyclineB dirige l'entrée en mitose et la progression jusqu'à l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique.

D'autres réarrangements cellulaires opèrent pendant la division, sous contrôle de kinases et de phosphatases. Par exemple, la séparation des centrosomes dépend de la kinase Nek2 et de la phosphatase PP1, la formation du fuseau bipolaire dépend des kinases AuroraA, AuroraC et Plk1 et des phosphatases PP6 et PP1, et la bi-orientation des kinétochores implique la kinase AuroraB et la phosphatase PP1. Une autre kinase mitotique importante, Plk1 (Polo-like kinase 1), activée par AuroraB, est impliquée dans l'entrée en mitose, la

séparation des centrosomes, la formation d'un fuseau bipolaire, la dissociation des cohésines des chromosomes, et l'ingression du sillon de division au début de la cytocinèse.

Le passage en anaphase et donc la sortie de mitose nécessite l'inactivation de Cdk1-cyclineB par dégradation de la cyclineB *via* le complexe APC (Anaphase Promoting Complex) une fois que le « Spindle Assembly Checkpoint » est satisfait (décrit dans le paragraphe suivant). De nombreux substrats sont alors déphosphorylés, notamment par les phosphatases PP1 et PP2A qui redeviennent actives en sortie de mitose. Cependant, les kinases AuroraB et Plk1 doivent encore rester actives pour le bon déroulement de la cytocinèse.

b. La notion de point de contrôle

La notion de point de contrôle, ou « checkpoint » en anglais, a été en premier lieu exposée par Hartwell et Weinert en 1989 (Hartwell & Weinert, 1989). Le concept est le suivant : si le déroulement d'une étape tardive du cycle, par exemple le passage en mitose, dépend du déroulement correct d'une étape plus précoce dans le cycle, par exemple la réplication correcte de l'ADN en phase S, on peut penser qu'au moment de déclencher l'étape tardive en question il existe un mécanisme qui vérifie si l'étape précoce requise a correctement été effectuée. Pour encore mieux illustrer ce concept, on peut citer Hartwell et Weinert : « We call these control mechanisms checkpoints [], because they appear to have the role of checking to see that prerequisites [] have been properly satisfied. ». Ainsi, ils ont montrés que le passage en mitose et la duplication du centrosome sont dépendants de la réplication de l'ADN lors de la phase S.

Il est assez extraordinaire de voir que le cycle cellulaire, sorte de parcours où différentes étapes se succèdent, est jonché de points de vérification tout comme un parcours de course d'orientation est ponctué de balises. Ces points de contrôle permettent de détecter des erreurs ou anomalies et de retarder l'entrée dans la phase suivante du cycle si une erreur est détectée, ceci afin de laisser le temps à la cellule de réparer l'erreur avant de continuer dans la suite du cycle. Les transitions où un mécanisme de contrôle est présent correspondent aux transitions critiques et irréversibles où une régulation rigoureuse est nécessaire au bon déroulement du cycle. On observe notamment 3 contrôles importants :

- à la transition G1/S : la cellule décide si elle va entrer dans un cycle de division cellulaire (phase S puis mitose) ou si elle reste dans un état de pause, la phase G0.
- à la transition G2/M : avant d'entrer en mitose, la cellule vérifie que son ADN est répliqué et qu'il n'y a pas d'erreur de réplication. Si des erreurs sont détectées, un mécanisme de réparation des erreurs est enclenché et la mitose retardée jusqu'à ce que toutes les erreurs soient réparées. Si la cellule est dans l'impossibilité de réparer les erreurs de réplication, l'apoptose est déclenchée afin d'éviter la prolifération d'une cellule comportant des erreurs dans son génome.

- à la transition métaphase/anaphase : la cellule vérifie que tous les chromosomes sont correctement attachés par les microtubules du fuseau mitotique et qu'ils sont correctement bi-orientés sur la plaque métaphasique avant de déclencher l'anaphase. Ceci afin d'éviter une ségrégation incorrecte du matériel génétique.

Ce dernier point de contrôle à la **transition métaphase/anaphase** est aussi appelé **« Spindle Assembly Checkpoint »** puisqu'il vérifie que le fuseau est correctement assemblé et que les chromosomes sont correctement alignés. Il est intéressant ici de s'attarder un peu sur le mécanisme moléculaire de ce point de contrôle pour deux raisons. La première, c'est qu'il illustre à merveille à quel point la signalisation intracellulaire peut être complexe et pourtant fonctionner comme les rouages bien huilés d'une horloge. Le paragraphe suivant lui est consacré. La seconde raison, c'est qu'il est intéressant de voir comment un mécanisme de réparation des erreurs d'attachement des chromosomes utilise la tension entre les deux kinétochores d'un même chromosome pour juger si ce chromosome est correctement attaché ou non. Ce mécanisme est décrit dans le paragraphe sur la bi-orientation des kinétochores grâce à AuroraB.

c. Le « Spindle Assembly Checkpoint »

Après la réplication de l'ADN en phase S, les chromosomes sont constitués d'une paire de chromatides sœurs qui sont maintenues ensemble par un complexe protéique, la cohésine. Pendant la métaphase, les chromatides sont capturées par les microtubules du fuseau mitotique au niveau de leur **kinétochore**, complexe protéique très spécialisé assemblé au niveau du centromère des chromatides. La Figure 2 schématise la structure du kinétochore, avec sa partie interne proche du centromère, et sa partie externe où viennent s'attacher les microtubules. Lors de la métaphase, les chromatides sœurs sont alignées sur la plaque métaphasique. Afin d'assurer la ségrégation des chromatides lors de l'anaphase, tous les kinétochores doivent être attachés par des microtubules du fuseau mitotique. Le Spindle Assembly Checkpoint est un **système de vérification** qui retarde le déclenchement de l'anaphase tant que tous les kinétochores ne sont pas attachés par des microtubules (Khodjakov & Pines, 2010).

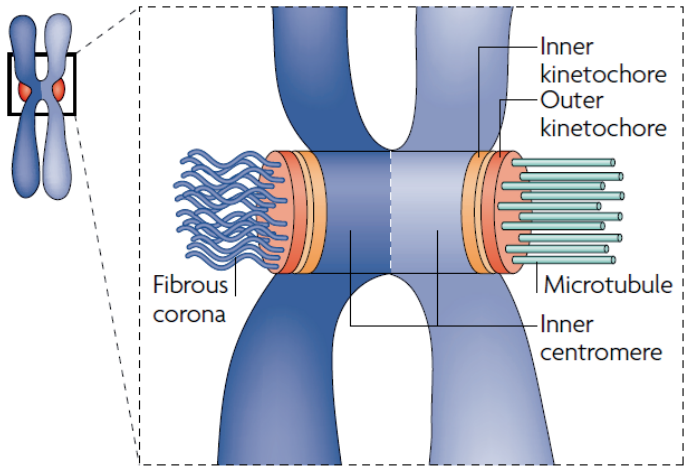


Figure 2 : Structure schématique du kinétochore.
Le kinétochore de gauche, qui n'est pas attaché aux microtubules contrairement au kinétochore de droite, laisse apparaître une zone riche en fibrilles, appelée fibrous corona. Les différents niveaux du kinétochore sont représentés : kinétochore intérieur, central et extérieur. Le centromère intérieur est la région de la chromatine entre les deux kinétochores. D'après (Cheeseman & A. Desai, 2008).

Dans la configuration où certains kinétochores ne sont pas attachés, le Spindle Assembly Checkpoint est activé (on dit également qu'il est ON ou non-satisfait) et empêche l'anaphase. La protéine Mad2 (mitotic arrest deficiency 2), découverte d'abord grâce à un crible chez la levure bourgeonnante (R. Li & Murray, 1991), est activée et inhibe le complexe APC (Anaphase Promoting Complex). Ce complexe APC n'étant pas actif, il ne permet pas la dégradation de la sécurine ; la sécurine inhibe alors la séparase ; la séparase étant une enzyme qui dégrade le complexe des cohésines qui maintiennent les chromatides sœurs ensembles, quand elle est inhibée, l'anaphase est empêchée. A l'inverse, une fois que tous les kinétochores sont attachés, le Spindle Assembly Chekpoint est inactivé (OFF ou satisfait) et autorise l'anaphase. Mad2 est inactivée, et selon la même cascade, le complexe APC n'est plus inhibé par Mad2, il ubiquitine alors la sécurine qui est dégradée par le protéasome, ceci levant l'inhibition de la séparase qui dégrade alors les cohésines et permet la séparation des chromatides sœurs et ainsi l'anaphase.

En réalité, ce mécanisme est encore plus complexe. La protéine Cdc20 est l'activateur de APC; quand Mad2 est activée elle se lie à Cdc20 et l'inhibe, donc inhibe APC. D'autres protéines, comme Mad1, BubR1 et Bub3 sont également impliquées dans le Spindle Assembly Checkpoint, introduisant d'autres niveaux de régulation. L'intérêt ici était de montrer à quel point des jeux de cascades d'activations, d'inhibitions et de dégradations sont au cœur d'un mécanisme très complexe et très robuste qui garantie qu'une étape extrêmement critique du cycle se déroule sans erreur : une fois les chromatides séparées, il n'y a plus de possibilité de corriger les erreurs.

d. Aurora B et la bi-orientation des kinétochores : un mécanisme de correction d'erreurs

Afin d'assurer la ségrégation de chacune des deux chromatides dans un noyau fils différent (ségrégation égale du matériel génétique), il est indispensable que chacun des kinétochores du même chromosome soit capturé par des microtubules provenant des pôles opposés : c'est la **bi-orientation**. Un système de réparation des erreurs d'attachement permet de déstabiliser un attachement incorrect et de stabiliser un attachement correct. Associé avec le contrôle du Spindle Assembly Checkpoint, l'anaphase est ainsi retardée tant que tous les kinétochores ne sont pas correctement bi-orientés.

Dans les années 1970, Nicklas observe grâce à des expériences de micromanipulation que la bi-orientation est dépendante de la tension exercée sur les chromosomes (Nicklas & Koch, 1969; Nicklas & S. C. Ward, 1994). Suite à la découverte de la protéine Ipl (increase-in-ploidy) chez la levure (C. S. Chan & Botstein, 1993) puis de ses homologues, les kinases Aurora (R Giet & C Prigent, 1999), la compréhension moléculaire de ce système s'améliore. Il est alors montré que si la protéine AuroraB est inhibée, de mauvais attachements se produisent, et que si l'inhibition de AuroraB est ensuite levée, il y a correction des erreurs d'attachement (voir (M. A. Lampson & Cheeseman, 2011) pour une revue). Il est montré également que la phosphorylation par AuroraB de ses substrats se produit en absence de tension, et que cela déstabilise les attachements incorrects. Ainsi nait l'idée que la tension au niveau des chromosomes et l'activité de AuroraB seraient toutes deux impliquées dans la bi-orientation des kinétochores. Une première hypothèse propose que la tension puisse directement réguler l'activité de AuroraB, mais les échelles de temps sont incompatibles avec la rapidité des réarrangements d'attachement. En 2009, Liu et collaborateurs proposent le modèle selon lequel **la tension exercée sur les kinétochores lorsque ceux-ci sont bi-orientés éloignerait AuroraB de ses substrats**, empêchant ainsi leur phosphorylation et la signalisation qui en découle (D. Liu et al., 2009).

D'un point de vue moléculaire, **AuroraB** fait partie du complexe CPC (Chromosomal Passenger Complex), avec les protéines INCENP, Survivin, et Borealin (Schumacher et al., 1998; Kaitna et al., 2000; Speliotes et al., 2000; Sampath et al., 2004). Ce complexe est présent au niveau des kinétochores internes en métaphase puis au niveau du fuseau central lors du passage en anaphase puis en cytocinèse. L'un des substrats de AuroraB est le **réseau KMN** (Figure 3) composé du complexe Ndc80, du complexe Mis12 et de la protéine KNL1. Ce réseau constitue **l'interface entre le microtubule et le kinétochore** (pour une revue voir (Cheeseman & A. Desai, 2008)) et se situe donc au niveau des kinétochores externes. Lorsque les kinétochores sont mal attachés (par exemple par des microtubules provenant du même pôle du fuseau), il n'y a pas de tension entre les kinétochores, AuroraB est proche du réseau KMN et phosphoryle le complexe Ndc80. Celui-ci perd son affinité avec le microtubule et le microtubule se détache. Si au contraire les kinétochores sont correctement bi-orientés, les microtubules provenant des pôles opposés tirent chacun de leur côté sur le

chromosome. Sous l'effet de la tension, les parties internes et externes des kinétochores s'éloignent, AuroraB ne phosphoryle plus le complexe Ndc80 et l'interaction microtubule-kinétochore est stabilisée. De façon intéressante, il a été montré récemment que la phosphatase PP1 contrecarre AuroraB pour assurer un contrôle en rétroaction (D. Liu et al., 2010). La phosphatase PP1 est recrutée par KNL1 au kinétochore extérieur. Lorsque AuroraB phosphoryle le réseau KMN (pas de tension), elle phosphoryle KNL1 qui ne peut pas recruter PP1. En revanche, s'il n'y a pas de phosphorylation de KNL1 (sous tension), KNL1 recrute PP1 qui déphosphoryle alors les composants du kinétochore extérieur, renforçant ainsi la non-phosphorylation par AuroraB. Ce mécanisme de correction des erreurs d'attachement des kinétochores est schématisé en Figure 4.

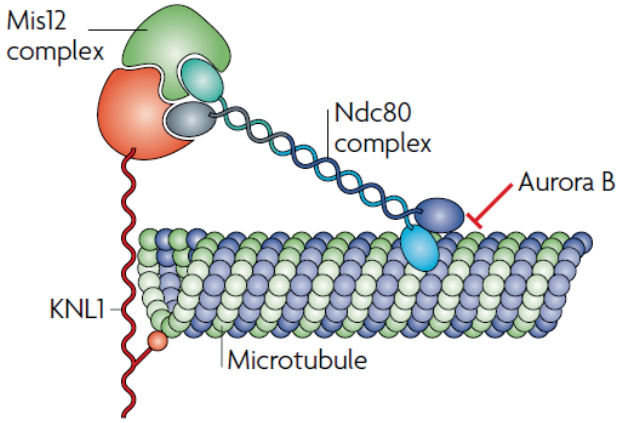


Figure 3 : Le réseau KMN, interface entre le kinétochore et le microtubule.
Le réseau KMN est composé du complexe Ndcd80, du complexe Mis12, et de la protéine KNL1. La phosphorylation par AuroraB de ce réseau déstabilise l'attachement du microtubule au kinétochore, alors que l'interaction est stabilisée lorsque le réseau n'est pas phosphorylé (pas de phosphorylation par AuroraB et déphosphorylation par PP1). D'après (Cheeseman & A. Desai, 2008).

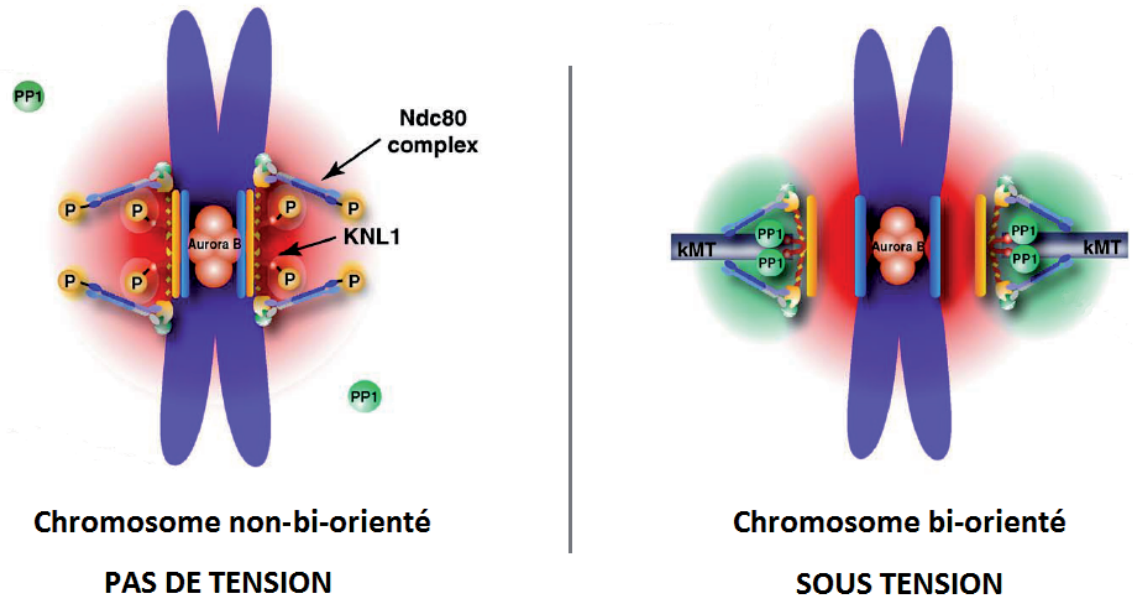


Figure 4 : Régulation de l'attachement des kinétochores par AuroraB
A gauche, le chromosome n'est pas attaché ou mal attaché, les kinétochores ne sont donc pas sous tension. AuroraB est proche de son substrat et le phosphoryle, déstabilisant l'attachement des microtubules. A droite, la tension entre les kinétochores atteste d'un attachement correct bi-orienté ; AuroraB est éloignée de ses substrat et l'attachement du microtubule est stabilisé, à la fois par la non-phosphorylation par AuroraB du réseau KMN et par sa dé-phosphorylation par la phosphatase PP1. Adapté de (M. A. Lampson & Cheeseman, 2011).

Pour conclure, on voit ici à quel point les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire sont complexes pour *in fine* i) vérifier s'il n'y a pas d'erreur de parcours et si la cellule est prête à passer à l'étape suivante, ii) détecter une erreur lorsqu'il y en a une, et iii) réparer les erreurs lorsqu'il y en a. Grâce aux actions antagonistes des kinases et des phosphatases, des mécanismes d'interrupteur et de rétroaction assurent la robustesse de ces contrôles. Dans l'exemple de la correction d'erreurs de bi-orientation des kinétochores, il est intéressant de noter comment une action physique et mécanique (les microtubules tirent de façon opposée sur les kinétochores, ce qui les met sous tension) est traduite en voie de signalisation (AuroraB qui phosphoryle ou non ses substrats). Nous en reparlerons dans la dernière partie de l'introduction ainsi que dans la discussion des résultats.

2. La cytocinèse et sa machinerie moléculaire

a. Définition et introduction sur la cytocinèse

La cytocinèse, ou cytodiérèse, est la dernière étape de la division cellulaire permettant la séparation du cytoplasme de la cellule mère en deux cellules filles. Elle suit généralement une mitose (séparation des chromatides). Elle permet donc la formation de deux cellules filles contenant chacune une copie de l'ADN de la cellule mère. Il est essentiel que la

cytocinèse soit **finement régulée**, à la fois **dans le temps et dans l'espace**, pour qu'elle soit parfaitement coordonnée avec la fin de la mitose. En effet, la cytocinèse doit avoir lieu uniquement une fois tous les chromosomes séparés, et elle doit avoir lieu au niveau de la région équatoriale afin que chaque cellule fille hérite d'un noyau complet.

Lorsque la cytocinèse est anormalement découplée du cycle cellulaire, cela provoque une forte instabilité génétique, le contenu en ADN variant d'une cellule à une autre (Mukherjee et al., 2009). Il a été montré depuis les années 1970 qu'un défaut de cytocinèse peut être hautement tumorigène. Des cellules multinucléées suite à une inhibition de la cytocinèse prolifèrent si elles sont transformées par le virus SV40, et non si elles sont saines, induisant une prolifération de cellules aneuploïdes (nombre anormal de chromosome) (Hirano & Kurimura, 1974). Ce mécanisme de contrôle qui empêche une cellule tétraploïde de se diviser (« Tetraploïdy checkpoint ») dépend de la protéine p53 et évite la propagation des erreurs de division (Andreassen et al., 2001).

De nombreuses **maladies** sont **associées à des défauts de cytocinèse** (Benjamin Lacroix & Maddox, 2012). On peut citer par exemple, outre le cancer, diverses maladies du sang, le syndrome de Lowe, ou encore la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Cependant, **certains défauts peuvent être physiologiques** et font partie de voies de signalisation régulées (Figure 5). Dans le foie, 30% des **hépatocytes** sont polyploïdes et représentent 90% de la masse totale du foie (Gupta, 2000). Après une division dont la cytocinèse est inhibée *via* l'insuline, les hépatocytes deviennent binucléés. Après une seconde division où les cellules réussissent à associer leurs 4 centrosomes pour former un fuseau bipolaire, les cellules rétablissent la mononucléation tout en restant tétraploïde. Un défaut de régulation de cette polyploïdie, que ce soit une diploïdie anormale ou une hyperpolyploïdie, est associé à des maladies. Un autre exemple bien connu est celui des **mégacaryocytes**, cellules spécialisées de la moelle osseuse qui produisent les plaquettes sanguines. Ces cellules sont capables d'atteindre une très haute polyploïdie (jusqu'à 128 copies des chromosomes, mais plus généralement entre 16 et 32 copies) par une succession d'endomitoses, c'est-à-dire plusieurs cycles cellulaires sans cytocinèse (Geddis & Kaushansky, 2006). Lorsque le mégacaryocyte atteint au moins 8 copies, il est fragmenté en une multitude de plaquettes.

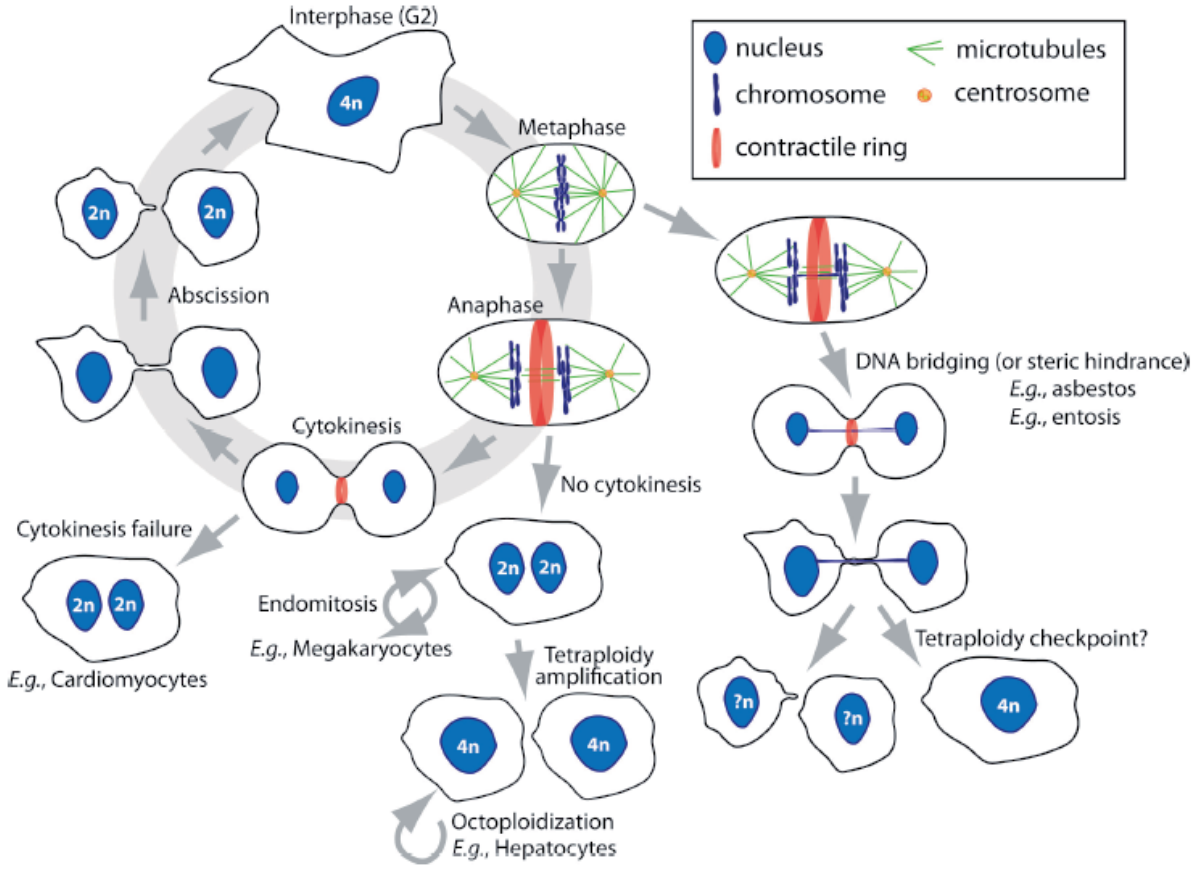


Figure 5 : Cycle cellulaire et défauts de cytocinèse physiologiques ou pathologiques
En haut à gauche, représentation du cycle cellulaire d'une cellule somatique normale. Les flèches sortant du cycle cellulaire représentent diverses voies d'inhibition de la cytocinèse. Les voies physiologiques sont présentées avec des exemples de types cellulaires (hépatocytes, cardiomyocytes, mégacaryocytes). Tiré de (Benjamin Lacroix & Maddox, 2012).

b. Différents mécanismes de cytocinèse

Les mécanismes de cytocinèse varient selon les organismes mais conservent les mêmes caractéristiques principales, à savoir : **i) la définition d'un plan de clivage ii) l'assemblage d'une structure équatoriale iii) la séparation du cytoplasme iv) la finalisation de la cytocinèse par l'abscission** (Guertin et al., 2002).

Chez les **plantes**, les microtubules et l'actine forment une structure dense entre les deux noyaux fils : le **phragmoplaste**. Des vésicules golgiennes contenant le matériel nécessaire à la formation de la paroi cellulaire sont dirigées vers ce phragmoplaste et s'y accumulent. Le phragmoplaste s'étend alors de l'intérieur de la cellule vers l'extérieur pour finalement rejoindre la paroi de la cellule avec qui il fusionne, séparant les deux cellules filles (Figure 6).

La **levure fissipare** *Schizosaccharomyces pombe*, en forme de bâtonnet, croit longitudinalement et se divise par **fission en son centre** (Figure 6). Le positionnement du site de clivage est déterminé essentiellement par la position du noyau, lui-même placé au centre de la cellule grâce au réseau de microtubules. En interphase, des amas de protéines

régulatrices (principalement des kinases) se forment au cortex cellulaire au niveau du noyau. En cytocinèse, ils recrutent la myosine puis l'actine et coalescent pour former un **anneau de constriction acto-myosique**. Après la séparation des chromosomes, l'anneau se contracte et un **septum** (cloison de paroi cellulaire spécialisée séparant les deux cellules) est formé de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule au fur et à mesure que l'anneau se contracte. Enfin, l'anneau est désassemblé et le septum dégradé, conduisant à la séparation des deux cellules filles. La constriction de l'anneau et la synthèse du septum sont étroitement liées ; il est suggéré que l'anneau soit physiquement lié aux enzymes qui synthétisent le septum. Même si les événements de septation sont assez bien décrits (régulation de la terminaison de la cytocinèse par la voie SIN ou Septation Initiation Network), les événements de fission membranaire au moment de séparer les deux cytoplasmes restent largement incompris.

Chez la **levure bourgeonnante** *Saccharomyces cerevisiae*, la cellule se divise par bourgeonnement. En interphase, la cellule forme un **bourgeon** qui croît progressivement. En mitose, l'ADN est réparti de façon égale entre la cellule mère et le bourgeon par alignement du fuseau mitotique avec l'axe cellule-bourgeon. Le site de clivage est déterminé très tôt dans le cycle (avant la mitose) puisqu'il correspond au cou du bourgeon, lui-même positionné à côté du précédent site de clivage (précédent bourgeon). Lors de la cytocinèse, un **anneau contractile d'actine et de myosine** se forme au niveau du cou du bourgeon. Lorsqu'il se contracte, un **septum** est synthétisé de la même façon que chez *S. pombe*. La dégradation du septum permet finalement la séparation du bourgeon et de la cellule mère.

Dans les **cellules animales**, l'**anneau contractile acto-myosique** est positionné lors de l'anaphase grâce aux microtubules qui définissent une zone équatoriale où la protéine RhoA est activée. La contraction de l'anneau aboutit à la formation d'un pont intercellulaire reliant les cellules filles (Figure 6). L'abscission, toute dernière étape de la cytocinèse, consiste en la coupure de ce pont intercellulaire, définissant ainsi deux cellules filles définitivement séparées. Le paragraphe suivant expose la régulation moléculaire de la cytocinèse dans les cellules animales, et les chapitres II et III décrivent en détail la composition du pont intercellulaire et comment celui-ci est coupé lors de l'abscission.

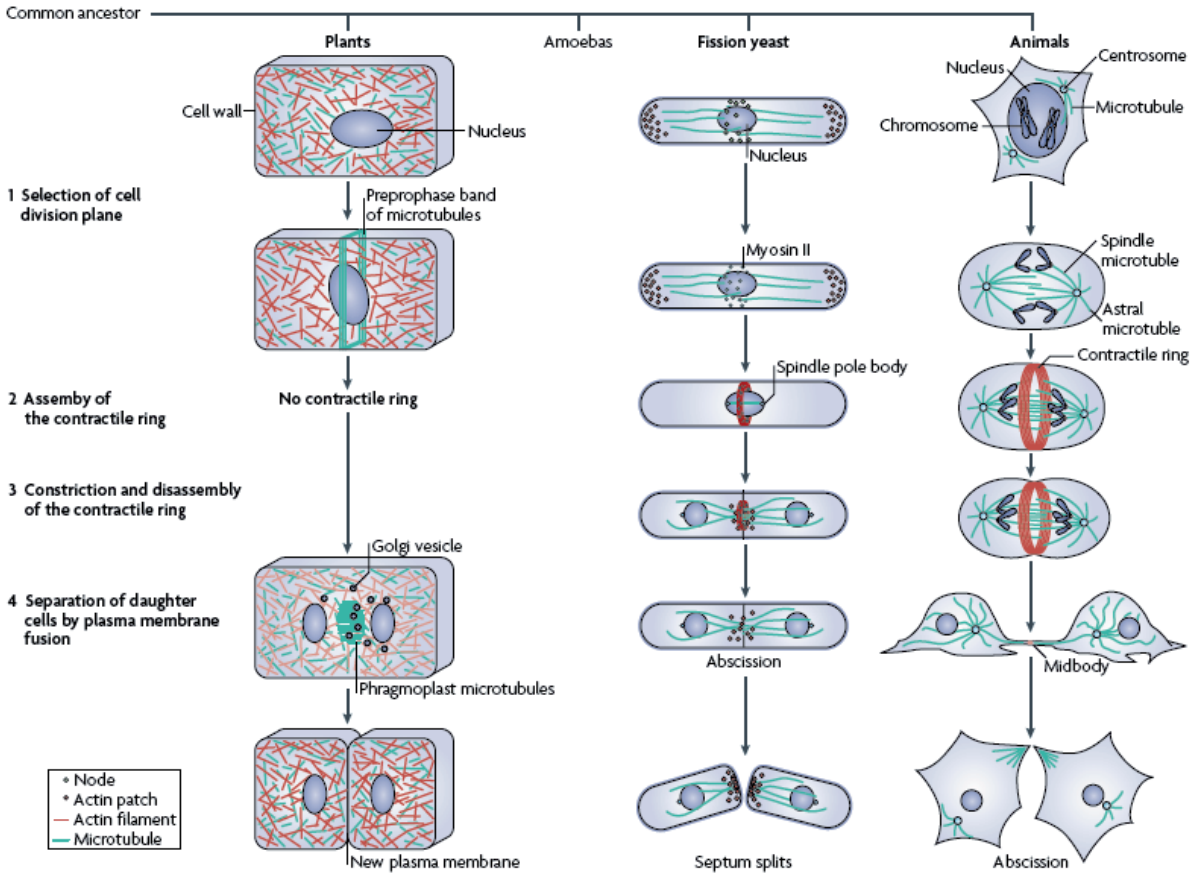


Figure 6 : Mécanismes de cytocinèse chez les plantes, les levures fissipares et les cellules animales
Se référer au texte pour la description des différents mécanismes de cytocinèse. D'après (Pollard & J.-Q. Wu, 2010).

Il est intéressant de remarquer ici que des défauts de cytocinèse peuvent conduire à différents phénotypes en fonction de l'étape qui est inhibée. Si le défaut intervient lors des étapes précoces de la cytocinèse, comme la définition du plan de division ou l'assemblage ou la contraction de l'anneau acto-myosique, il conduit à la formation d'une cellule binucléée, soit par complète inhibition de la cytocinèse (Figure 7 A), soit par ingression partielle du sillon puis une relâche de l'anneau (Figure 7 B). Si l'anneau est capable de se contracter mais la stabilité du pont intercellulaire mal établie, il y a alors relâche du pont après sa formation et fusion des deux cellules filles (Figure 7 C). Enfin, si le défaut intervient encore plus tard, notamment une fois que le pont intercellulaire est formé et stabilisé, cela mène à des cellules filles reliées par un pont de façon permanente, parfois même jusqu'à la division suivante (Figure 7 D). Certains phénotypes plus subtiles sont identifiables en suivant le déroulement dans le temps des différentes étapes de la cytocinèse : délai de formation de l'anneau, rallongement du temps de constriction de l'anneau, ou délai d'abscission. Cela révèle souvent une importance de la protéine étudiée sans qu'elle soit indispensable.

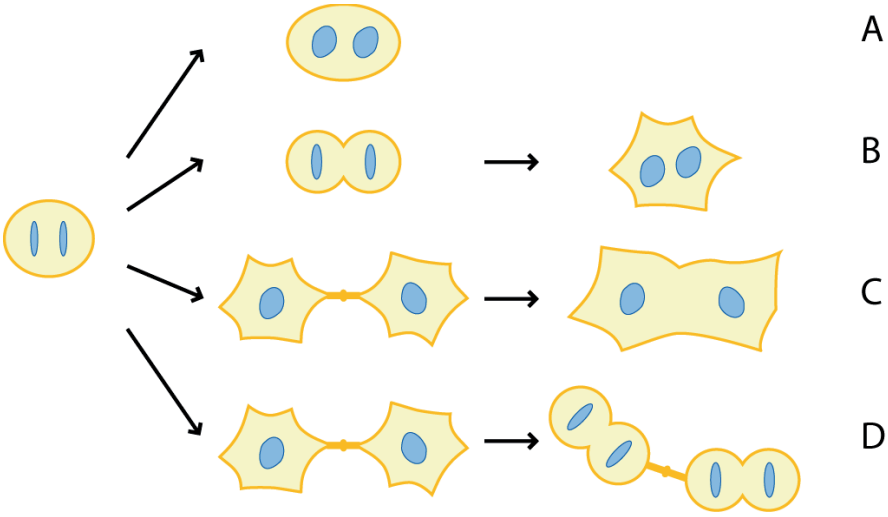


Figure 7 : Défauts de cytocinèse plus ou moins tardifs
En fonction de l'étape qui est inhibée, les cellules adoptent différentes configurations. A) pas de formation de l'anneau contractile, binucléation immédiate. B) Assemblage de l'anneau puis contraction incomplète, menant à une régression de l'anneau et une binucléation. C) Assemblage et contraction correcte de l'anneau, formation du pont intercellulaire, mais mauvaise stabilité du pont et refusion des deux cellules filles. D) Défaut de coupure du pont : les cellules filles restent plus longtemps connectées par le pont, parfois même jusqu'à la division suivante.

c. L'orchestration moléculaire de la cytocinèse

La cytocinèse est déclenchée lors de la transition métaphase/anaphase. Lorsque le Spindle Assembly Checkpoint est satisfait, le complexe APC induit non seulement la dégradation de la sécurine (ce qui permet la séparation des chromatides sœurs) mais également la dégradation de la cyclineB par ubiquitination et dégradation par le protéasome. La dégradation de la cyclineB inactive alors Cdk1. Cette **inactivation de Cdk1** conduit à un profond réarrangement du cytosquelette permettant le positionnement de l'anneau contractile, la contraction de l'anneau et la formation du pont intercellulaire. Ce pont cytoplasmique reliant les deux cellules filles sera ensuite coupé lors de l'étape finale de la cytocinèse, l'abscission.

Dans les années 2004-2005, quatre grands criblages à haut débit, utilisant une approche de délétion par siRNA ou d'inhibition par des petites molécules chez les cellules de Drosophile ou dans l'embryon du nématode *C. elegans*, ont permis d'identifier de nombreuses protéines impliquées dans la cytocinèse, au niveau structural ou régulationnel (Echard et al., 2004; Skop et al., 2004; Eggert et al., 2004; Sönnichsen et al., 2005). Par la suite, de nombreuses études ont identifié leurs homologues chez les cellules de mammifère, permettant ainsi d'arriver à une meilleure compréhension moléculaire de la cytocinèse (pour une revue voir (Glotzer, 2005)). Dans ce paragraphe, je propose de passer en revue les grandes lignes de cette orchestration moléculaire en se focalisant sur les cellules mammifères.

Formation du fuseau central

Lors du passage en anaphase, les chromatides sont tirées vers les pôles par les microtubules du fuseau, c'est l'anaphase A. Entre les deux jeux de chromatides se séparant, d'autres microtubules sont présents et contribuent, par l'action de moteur moléculaires, à pousser les chromatides vers les pôles, c'est l'anaphase B. Ces microtubules centraux, se chevauchant au niveau de la zone équatoriale, constituent le **fuseau central**. Le fuseau central joue un rôle primordial dans la définition du plan de clivage. La protéine **PRC1** (Protein Regulating Cytokinesis 1) est une protéine associée aux microtubules (MAP ou Microtubule Associated Protein) qui lie les microtubules antiparallèles, formant des faisceaux très compacts. Pendant la métaphase, Cdk1 inhibe la liaison de PRC1 avec les microtubules, empêchant une trop forte association des microtubules entre eux pendant la division. A la transition métaphase/anaphase, Cdk1 est dégradée et PRC1 activée, formant alors le fuseau central en associant fortement les microtubules présents entre les chromatides (Mollinari et al., 2002). PRC1 interagit également avec KIF4, une kinésine-4, qui aide, à former un fuseau bien compact en restreignant PRC1 au centre du fuseau au niveau de la zone de chevauchement des microtubules (Kurasawa et al., 2004).

Le complexe **Centralspindlin** est un hétérotétramère comportant deux protéines **MKLP1** (ou ZEN-4), protéines de la famille des kinésine-6, et deux protéines **MgcRacGAP** (ou CYK-4), protéines régulatrices des GTPases de la famille Rho (Mishima et al., 2002). Pendant la métaphase, Cdk1 phosphoryle MKLP1, ce qui diminue son activité de moteur en diminuant son affinité avec les microtubules. Lors du passage en anaphase, Cdk1 est dégradée et MKLP1 retrouve son affinité pour les microtubules (Mishima et al., 2004), localisant ainsi le Centralspindlin au fuseau central. De plus, la kinase AuroraB faisant partie du CPC ou Chromosomal Passenger Complex (pour une revue récente voir : (Van der Waal et al., 2012)), est localisée au niveau des kinétochores en métaphase. En anaphase, elle est transloquée vers le fuseau central grâce à la kinésine-6 MKLP2 (Gruneberg et al., 2004), l'interaction entre le CPC et MKLP2 étant possible grâce à la dégradation de Cdk1 en sortie de mitose (Hümmer & Mayer, 2009). AuroraB phosphoryle alors le Centralspindlin, renforçant l'activité du moteur kinésine de MKLP1 (Guse et al., 2005) et l'activité GAP de MgcRacGAP (Minoshima et al., 2003).

Définition du plan de clivage

La protéine **ECT2**, activatrice de RhoA (Tatsumoto et al., 1999; Su et al., 2011), joue un rôle essentiel dans la définition du plan de clivage. ECT2 se lie au Centralspindlin *via* une interaction avec MgcRacGAP (Somers & Saint, 2003) et est ainsi localisée au fuseau central. La conséquence directe est l'**activation de façon locale de la GTPase RhoA**, définissant le plan de clivage. RhoA activée, véritable chef d'orchestre de la cytocinèse, induit ensuite la formation et la contraction de l'anneau acto-myosique.

Pour mieux comprendre la régulation de la cytocinèse, il est important de présenter la grande famille des GTPases. Ces protéines, utilisant le GTP comme interrupteur moléculaire, changent de conformation selon qu'elles sont liées à un GTP ou un GDP, et possèdent une activité d'hydrolyse du GTP en GDP (d'où le nom de GTPases). Elles recrutent des effecteurs spécifiques lorsqu'elles sont associées au GTP, d'où leur état activé lorsqu'elles sont liées au GTP. Elles sont régulées par d'autres protéines, qui vont soit activer l'hydrolyse du GTP en GDP (action inhibitrice par les GAP, GTPase Activating Protein), soit favoriser l'échange du GDP en GTP (action activatrice par les GEF, Guanine-nucleotide Exchange Factor), soit empêcher la libération du GDP et bloquer la GTPase en mode inactive (action inhibitrice des GDI, Guanine-nucleotide dissociation inhibitors). On distingue les GTPases associées à un récepteur membranaire et les GTPases libres dans le cytoplasme (on parle aussi de petite protéine G). Il existe plusieurs familles de protéines G : famille Ras, famille Rab, famille Ran, famille Ral, famille Arf, famille Rho.

Ainsi, l'association de ECT2 avec le Centralspindlin conduit à un paradoxe quant à la régulation des GTPases au niveau du fuseau central, puisqu'il y a à la fois une protéine activatrice (la GEF ECT2) et une protéine inhibitrice (la GAP MgcRacGAP) qui sont localisées au même endroit. Si l'activité GEF de ECT2 envers RhoA ne semble pas être remise en cause par la communauté scientifique, deux modèles différents proposent une explication concernant le rôle de MgcRacGAP. Le premier modèle est celui d'un flux de RhoA. Il décrit que l'activité GAP de MgcRacGAP serait dirigée vers RhoA, inhibant ainsi RhoA. En parallèle, ECT2 (GEF) activerait RhoA. Cela permettrait une très forte dynamique de RhoA, avec une succession très rapide d'inhibition et d'activation de RhoA. Cela apporterait de la robustesse et de l'adaptabilité dans la définition du plan de clivage (Miller & Bement, 2009). Le second modèle propose que l'activité GAP de MgcRacGAP soit dirigée vers une autre GTPase de la famille Rho : Rac. Rac est à l'origine d'une voie de signalisation aboutissant à la polymérisation de l'actine branchée par activation du complexe Arp2/3 *via* WASP et WAVE (Canman et al., 2008). Ainsi, l'inhibition de Rac par MgcRacGAP permettrait d'inhiber la formation d'actine branchée en zone équatoriale. Ces deux modèles sont présentés en Figure 8.

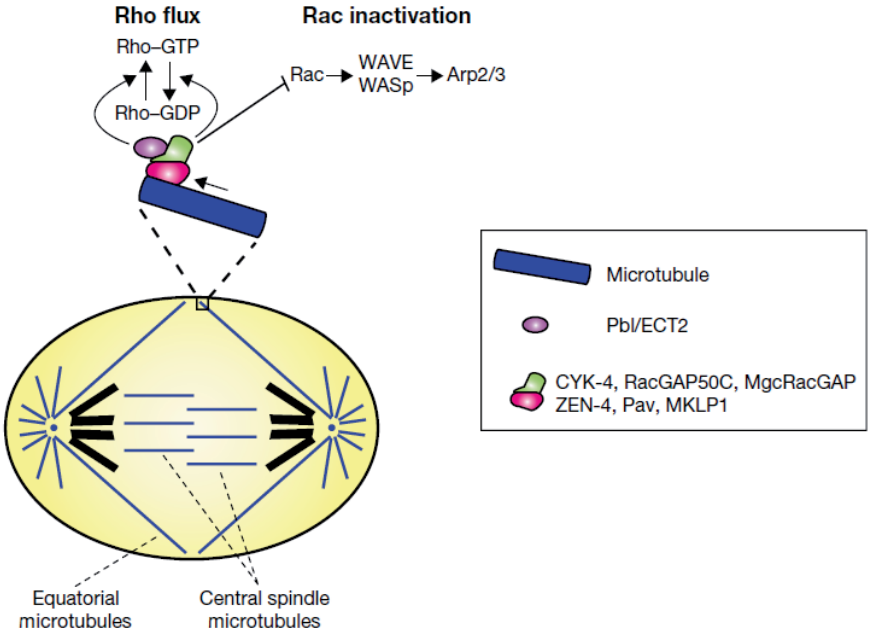


Figure 8 : Régulation des Rho GTPases et définition du plan de clivage en cytocinèse
En anaphase, les microtubules du fuseau central délivrent le complexe Centralspindlin (MKLP1 et MgcRacGAP) au cortex équatorial de la cellule. La protéine ECT2, s'associant au complexe Centralspindlin est également délivrée à l'équateur. Ainsi, RhoA est activée localement par ECT2 et en parallèle MgcRacGAP inhibe RhoA, augmentant ainsi la dynamique de RhoA. MgcRacGAP inhibe également Rac, ce qui empêche la formation d'actine branchée par la voie WASP/WAVE et Arp2/3. D'après (D'Avino & Glover, 2009).

Assemblage et contraction de l'anneau acto-myosique

L'**activation de RhoA**, restreinte à la zone équatoriale de la cellule, est à l'origine d'une voie de signalisation qui active la **polymérisation de l'actine** et **active la myosine-II**, moteur moléculaire indispensable à la contraction de l'anneau (Kosako et al., 2000). Les principaux effecteurs de RhoA dans la cytocinèse sont les formines et la kinase ROCK. La **formine mDia**, aidée de sa partenaire la **profiline**, induit la polymérisation d'un réseau de filaments parallèles d'actine non branchée (F Chang et al., 1997; N. Watanabe et al., 1997) composant l'anneau. La protéine **cofiline** est également importante pour la fonctionnalité de l'anneau puisqu'elle augmente la dynamique du réseau d'actine par son activité de coupure des filaments d'actine (Q. Chen & Pollard, 2011). La voie parallèle d'inhibition de Rac par MgcRacGAP empêche la formation d'actine branchée, permettant un anneau uniquement composé de fibres parallèles. La kinase **ROCK** ou Rho-Kinase, activée par RhoA, phosphoryle la **chaîne légère régulatrice de la myosine-II** (rMlc) (Amano et al., 1996), ce qui active la myosine-II et permet la contraction de l'anneau. Ensemble ces deux voies de signalisation assurent de façon robuste l'assemblage et la fonctionnalité de l'anneau contractile acto-myosique (Figure 9).

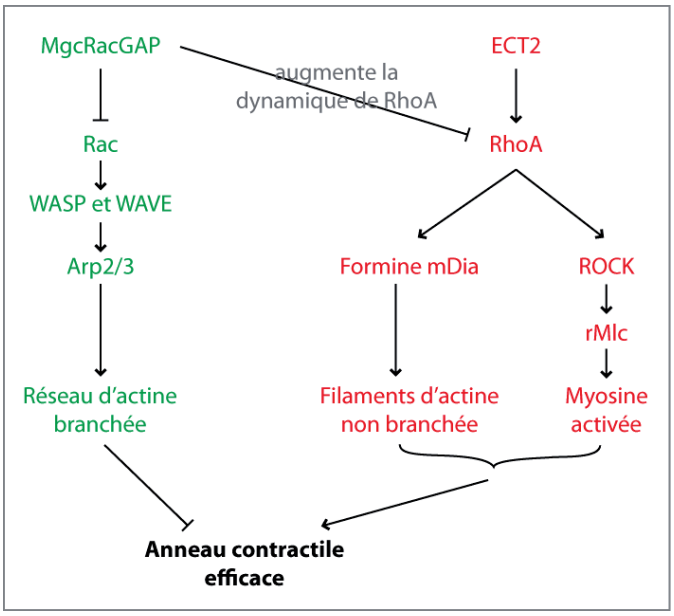


Figure 9 : Deux voies de régulation de la formation de l'anneau contractile

D'autres effecteurs de RhoA sont importants dans la cytocinèse. La Citron Kinase (ou Citron-K) et l'anilline sont recrutées et activées par RhoA au niveau du pont intercellulaire. L'enrichissement de PIP2 au niveau du pont recrute également d'autres protéines, comme les septines et la moesine. Ces constituants sont essentiels à la stabilisation du pont et permettent d'éviter une relâche du pont aboutissant à la fusion des deux cellules filles. Ils seront abordés en détail dans le paragraphe consacré à la stabilisation du pont.

Finalement, l'anneau contractile acto-myosique se resserre autour du fuseau central, le pince, et forme un pont intercellulaire cytoplasmique reliant les deux cellules filles. Le pont comporte alors les microtubules issus du fuseau central, leurs bouts « plus » se chevauchant au centre du pont. La majorité des protéines présentes au fuseau central se retrouvent naturellement au niveau du pont, comme AuroraB par exemple. D'autres protéines seront dirigées plus tard au pont *via* le transport le long des microtubules. L'organisation du pont ainsi que ses différents constituants seront décrits dans le paragraphe II. dédié au pont intercellulaire.

3. Polarité et cytocinèse

En cytocinèse, la polarité cellulaire est très marquée puisque la cellule doit former un anneau contractile dans la région équatoriale et nulle part ailleurs. En conséquence, le bon déroulement de la cytocinèse dépend de la localisation très précise de certains facteurs clés. En parallèle de la cytocinèse, les cellules filles doivent également se réétaler sur leur substrat, adoptant de nouveau la morphologie de cellules en interphase. Il est alors intéressant de comparer la polarité des cellules en cytocinèse avec celle des cellules en

interphase, en particulier lors de la migration (forte polarité). La polarité cellulaire implique une multitude de facteurs, que ce soit en cytocinèse ou en migration. J'ai choisi ici de décrire deux grands types de molécules, essentielles pour le fonctionnement de la cytocinèse et en quelque sorte à l'origine de la polarisation de beaucoup d'autres facteurs : les GTPases RhoA et Rac1, et les phospholipides PIP2 et PIP3.

a. RhoA et Rac1

Les trois GTPases de la famille Rho (RhoA, Rac1, Cdc42), bien que faisant partie de la même famille, ont des effecteurs, des fonctions et des régulations spécifiques. Toutes ces spécificités de régulation ne sont pas encore bien comprises au niveau moléculaire, mais certains modèles expliquent en partie cette complexité. Il est proposé que les **activités de RhoA et Rac1 soient mutuellement exclusives** (Rottner et al., 1999), donnant lieu à une localisation cellulaire complémentaire en terme d'activité. Un mécanisme proposé serait le fait que PAK, un effecteur de Rac1 phosphorylant RhoGDI, libèrerait Rac1 de son inhibition mais garderait RhoA inhibé (DerMardirossian et al., 2004). Ainsi, là où Rac1 est actif, RhoA est inhibé, et inversement.

En cytocinèse, RhoA est concentrée au niveau de l'équateur alors que Rac1 est présente aux extrémités des cellules filles, dans la zone de réétalement dynamique (Yoshizaki et al., 2003). Dans une cellule en migration, Rac1 est également active au front de migration (Kraynov et al., 2000), alors que RhoA est présente dans le reste du cytoplasme, à l'arrière de la cellule (Figure 10).

b. PIP2 et PIP3

Une autre catégorie très importante de facteurs régulant la cytocinèse est celle des phospholipides PIP ou Phosphatidyl-inositol-phosphate. La synthèse des PIP se fait par phosphorylation du groupe inositol des phosphoinositides (ou PI) en position 3, 4 ou 5 ; les PI pouvant être phosphorylés 1, 2 ou 3 fois. Plusieurs kinases ou phosphatases vont ainsi permettre la synthèse des différentes variations de PIP. Par soucis de clarté et de simplicité, j'utiliserai les abréviations suivantes dans le reste de la thèse :

- **PIP2** = PI(4,5)P2 ou PtdIns(4,5)P2 = deux phosphorylations aux positions 4 et 5
- **PIP3** = PI(3,4,5)P3 ou PtdIns(3,4,5)P3 = trois phosphorylations aux positions 3, 4, et 5
- la PtdIns(4,5)P2-3kinase ou **PI3K** phosphoryle le PIP2 en PIP3
- inversement, la phosphatase **PTEN** déphosphoryle le PIP3 en PIP2

Au cours de la cytocinèse, la localisation correcte du PIP2 et du PIP3 est absolument essentielle à son bon déroulement. Le PIP2 est localisé à l'équateur (S. J. Field et al., 2005) et le PIP3 aux extrémités des cellules filles (Janetopoulos et al., 2005). De façon cohérente, la

phosphatase PTEN est localisée au sillon de division et la kinase PI3K est localisée aux extrémités des cellules filles, assurant cette polarisation des PIP (Janetopoulos et al., 2005). Dans une cellule en migration, la polarisation des PIP est également très importante. La PI3K est localisée au front de migration et maintient un niveau élevé de PIP3, alors que PTEN se trouve à l'arrière de la cellule où on retrouve majoritairement du PIP2 (Devreotes & Janetopoulos, 2003; Yoo et al., 2010).

Une des fonctions essentielles des PIP est la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. On comprend alors que la polarisation des PIP soit impliquée à la fois en cytocinèse et lors de la migration cellulaire. De plus, la polarisation des PIP est également liée d'une certaine façon à la polarisation de RhoA et Rac1 puisque la PI3K et les Rho-GTPases font partie d'une même boucle de rétroaction (Weiner et al., 2002). La Figure 10 représente schématiquement les localisations des couples RhoA/Rac1 et PIP2/PIP3. On remarque très clairement la localisation identique de RhoA et du PIP2, à l'opposé de la localisation de Rac1 identique à celle du PIP3.

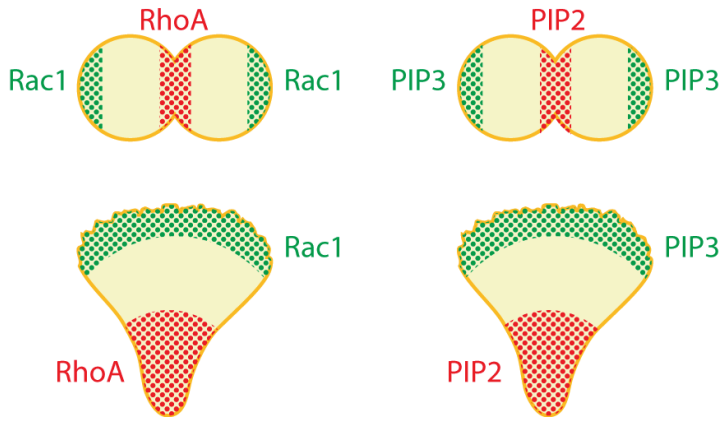


Figure 10 : Comparaison de la polarité en cytocinèse et en migration
Les couples RhoA/Rac1 et PIP2/PIP3 sont présentés à gauche et à droite respectivement ; les cellules en cytocinèse et en migration sont présentées en haut et en bas respectivement. On note la localisation identique de RhoA et du PIP2, à l'opposé de la localisation de Rac1 identique à celle du PIP3.

c. Polarité en cytocinèse *versus* en migration

Lors de la migration, les cellules sont polarisées suivant un axe avant-arrière. Lors du passage en mitose, les cellules perdent cette polarité bidimensionnelle, la plupart des composants étant redistribués de façon égale soit dans le cytoplasme soit à la membrane plasmique. En revanche, en sortie de mitose lors de la cytocinèse, les cellules filles rétablissent une polarité lors de l'ingression du sillon. Il est intéressant de remarquer que la **polarité établie en cytocinèse est très similaire à celle de la migration**. Si on se focalise sur une seule des deux cellules filles en cytocinèse, on voit apparaître un front de migration riche en Rac1 et PIP3, et un arrière plus contractile riche en RhoA et PIP2 (voir Figure 11). Une fois les cellules filles ré-

adhérées, elles vont alors migrer grâce à cette polarité. J'ai pu observer lors de mes expériences des cellules filles très motiles juste après une division alors qu'elles ne l'étaient pas du tout en interphase. Le phénomène est encore plus visible lorsque les cellules sont cultivées sur des lignes adhésives (migration 1D et mise en place de la polarité renforcée grâce à l'élongation des cellules), où les cellules HeLa Kyoto ne sont pas du tout motiles sauf si elles viennent juste de se diviser (Film 2 et Film 3). Une question intéressante est alors d'étudier comment cette période de forte motilité est établie. Cela pourrait être dû à une persistance de la polarité acquise pendant la cytocinèse, avec l'idée d'une durée fixe pendant laquelle la cellule conserve cette polarité et donc une certaine motilité. Une autre hypothèse serait de corréler ce maintien de polarité et donc de motilité avec l'abscission, le maintien du pont intercellulaire aidant au maintien de la polarité. Ce point sera développé plus en détail dans la partie discussion.

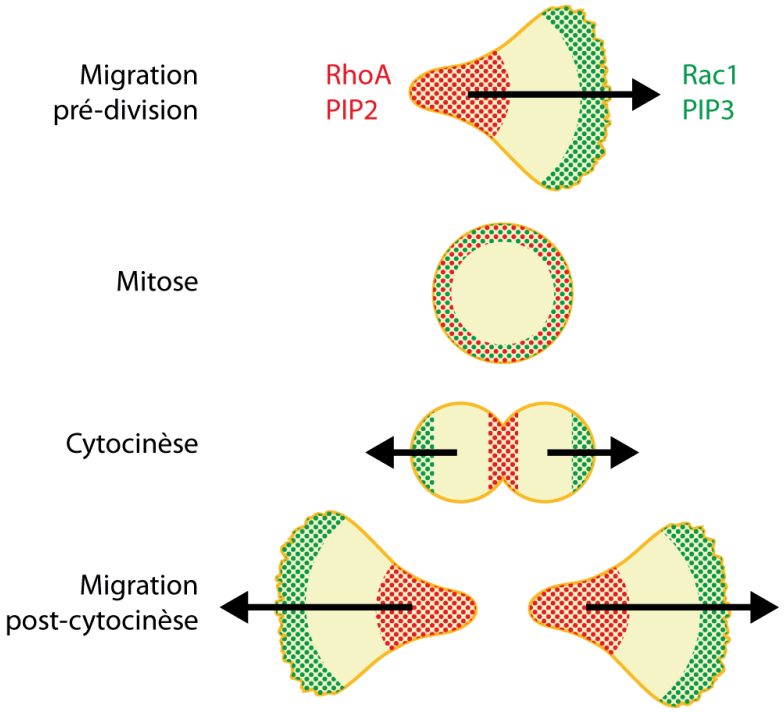


Figure 11 : Evolution de la polarité au cours du cycle cellulaire
Du haut vers le bas : cellule en migration avant une division, avec une polarité selon l'axe avant-arrière bien définie ; cellule en mitose, l'arrondissement étant accompagné d'une perte de polarisation ; cellule en cytocinèse qui ré-établit une polarisation pour former l'anneau contractile en région équatoriale ; réétalement post-mitotique et conservation de la polarisation acquise lors de la cytocinèse permettant une migration active. Les flèches représentent la direction de migration, l'axe de polarité étant colinéaire à cette direction.

4. Adhésion et cytocinèse

L'entrée en mitose s'accompagne d'un **remodelage drastique de la morphologie cellulaire**. En effet, la cellule, que ce soit au sein d'un tissu ou isolée en culture *in vitro*, s'arrondie suite à une réorganisation du cytosquelette d'actine et des adhésions focales. Cet arrondissement

est souvent associé à un affaiblissement des adhésions entre la cellule et son environnement. En culture *in vitro*, les cellules maintiennent une faible adhésion avec le substrat grâce aux fibres de rétraction, décrites dans le premier paragraphe de ce sous-chapitre. Une fois la mitose terminée, la cellule doit rétablir ses adhésions avec son environnement, et ce de façon concomitante avec le déroulement de la cytocinèse. Ceci est décrit dans le second paragraphe. Enfin, il a été montré que les intégrines, acteurs majeurs de l'adhésion cellulaire, régulent de nombreuses étapes du cycle cellulaire, et notamment la cytocinèse. Cela constitue le troisième paragraphe.

a. Fibres de rétraction

En début de mitose, les adhésions focales se dissocient tout en gardant quelques points de contact au substrat. Le cortex d'actine et de myosine-II se contracte, permettant l'arrondissement de la cellule. Lors de cette contraction, la cellule laisse derrière elle des **fibres de rétraction** ancrées au substrat au niveau des points de contact restants (Figure 12). Ces fibres, composées essentiellement d'actine très dense et très stable (étude par photoactivation de l'actine : (L. P. Cramer & T J Mitchison, 1997)), ancrent la cellule ronde mitotique au substrat. Cela permet à la cellule de maintenir une adhérence avec son environnement même pendant la division. En particulier, ces fibres de rétraction jouent un rôle important pour l'orientation du fuseau mitotique. Des expériences d'ablation et d'étirement ont montré qu'elles participent à la transmission des forces de l'environnement extracellulaire vers la cellule en mitose, orientant ainsi le fuseau dans l'axe des forces exercées sur la cellule (Fink et al., 2011).

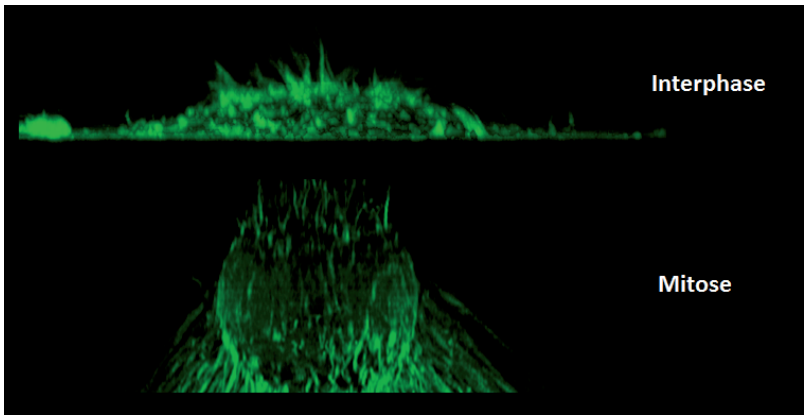


Figure 12 : Fibres de rétraction en mitose
Vues de côté d'une cellule en interphase (en haut, environ 5 µm de hauteur) et d'une cellule en mitose (en bas, environ 20 µm de hauteur). On observe les fibres de rétraction faisant le lien entre le substrat et la cellule mitotique. Images de Jenny Fink : cellules HeLa exprimant un marqueur de membrane plasmique MyrPalm-GFP. Reconstitution d'une acquisition en Z au microscope confocal spinning disk.

b. Réétalement post-mitotique

Après la mitose, les cellules filles se ré-étalent sur leur substrat. Cramer et Mitchison proposent en 1993 (L. Cramer & T J Mitchison, 1993) un modèle selon lequel les cellules établissent un **front d'étalement qui utilise les fibres de rétraction comme guide**, avec comme moteur le cytosquelette d'actine. La coupure des fibres de rétraction au moyen d'une micropipette empêche le réétalement au niveau de l'ablation sans perturber le réétalement au niveau des autres fibres de rétraction. Ils montrent également en 1995 que le réétalement est dépendant de la myosine-II qui tire le front d'étalement le long des fibres de rétraction vers le substrat (L. P. Cramer & T J Mitchison, 1995).

Il est proposé également que les **cellules filles se ré-étalent sur l'empreinte laissée par la cellule mère** avant de rentrer en mitose (Manuel Théry & Michel Bornens, 2006). Dans cet exemple, des cellules HeLa sont cultivées sur une surface silanisée où elles sécrètent leur propre matrice extracellulaire. En mitose, la cellule s'arrondit, laissant derrière elle une empreinte adhésive. Les cellules filles se ré-étalent alors selon la forme de cette empreinte (Figure 13). Il est à noter qu'il s'agit ici du réétalement juste après la mitose. Cette corrélation entre forme des cellules filles et forme de la cellule mère est observable pendant un certain temps, puis se perd petit à petit. Cette perte de corrélation est pour le moment mal caractérisée, mais j'ai eu l'occasion de travailler sur cette question lors d'un séjour au Marine Biological Laboratory de Woods Hole. Il serait intéressant d'étudier s'il existe une corrélation entre l'abscission du pont et cette perte de « mémoire de forme ».

Dans les tissus, la cellule en division ne perd pas forcément le contact avec les cellules voisines. En revanche, les deux cellules filles doivent établir de **nouvelles jonctions cellule-cellule** entre elles-mêmes à l'issue de la division. La formation de cette jonction cellule-cellule post-mitotique est encore très mal connue, et il est légitime de se poser la question du rôle du pont intercellulaire dans ce contexte. Ce point sera abordé lors de la discussion.

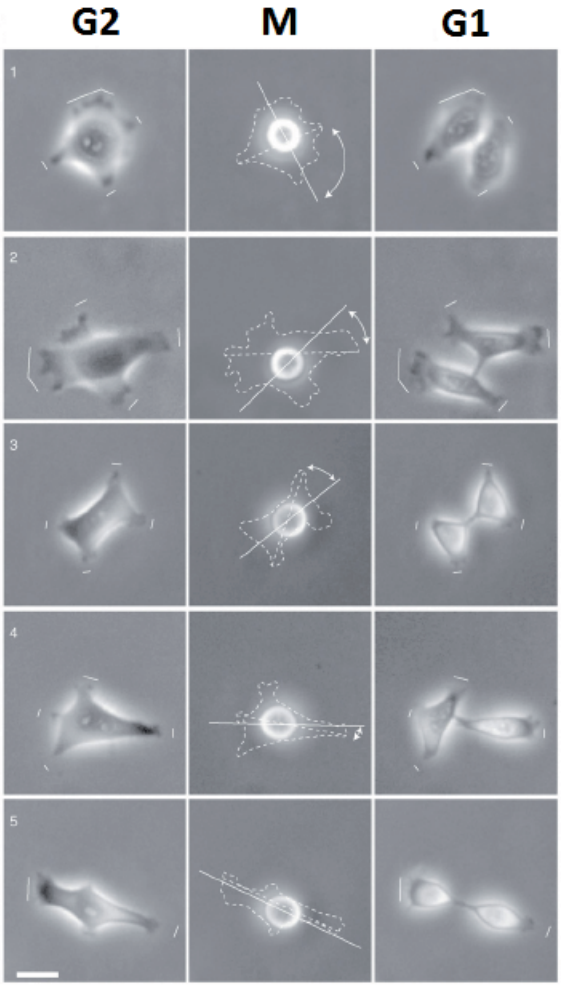


Figure 13 : Réétalement des cellules filles sur l'empreinte de la cellule mère
Image publiée par (Manuel Théry & Michel Bornens, 2006). Acquisition en vidéomicroscopie en contraste de phase de cellules HeLa cultivées dans un milieu appauvri en sérum et sur un substrat silanisé. G2 : image de la cellule mère 5 min avant l'arrondissement d'entrée en mitose. Les marques blanches servent de repère pour le contour de la cellule mère. Elles sont représentées également sur les cellules en G1. M : même cellule en métaphase. Les formes en pointillés représentent le contour de la cellule mère, la droite en pointillés représente l'axe le plus long de la cellule mère, la droite en trait plein l'axe de division (perpendiculaire à la plaque métaphasique). G1 : cellules filles 10 à 15 min après le début de l'anaphase. Barre d'échelle : 30 µm.

c. Régulation de la cytocinèse par les adhésions

De façon générale, les adhésions sont largement régulées au cours de la mitose. Un exemple intéressant est celui de la GTPase Rap1 (Dao et al., 2009) : activatrice de plusieurs intégrines, elle est inactivée en entrée de mitose pour permettre l'arrondissement, et ré-activée en sortie de mitose pour permettre le réétalement des cellules filles. Ces régulations sont essentielles aux changements morphologiques cellulaires, puisqu'un mutant constitutivement actif de Rap1 empêche l'arrondissement, provoquant des défauts de division et de cytocinèse, et un mutant dominant négatif de Rap1 empêche le réétalement en fin de mitose. Les adhésions focales, en tant que complexe moléculaire, pourraient avoir

un rôle de signalisation essentielle à la cytocinèse. Entre autre, les protéines Crk et Paxilline, composants des adhésions focales, sont localisées au pont intercellulaire et sont nécessaires au bon déroulement de la cytocinèse (Shafikhani et al., 2008).

Enfin, il a été montré que les **intégrines**, acteurs majeurs de l'adhésion, régulent de nombreuses étapes du cycle cellulaire et notamment la cytocinèse. Récepteurs membranaires de plusieurs composants de la matrice extracellulaire, les intégrines sont des protéines transmembranaires qui initient la formation des adhésions focales. L'expression de l'intégrine-β dont le domaine cytoplasmique est muté (Reverte et al., 2006) provoque d'importants défauts de cytocinèse avec accumulation de cellules binucléées (l'anneau contractile se forme mais régresse, provoquant la re-fusion des cellules filles). Pellinen et collaborateurs ont décrit précisément la **localisation des intégrines au cours de la cytocinèse** (Figure 14). En début de cytocinèse, les intégrines sont majoritairement localisées au sillon d'ingression ; une fois le pont formé, elles s'accumulent en dessous du pont, suggérant un rôle d'ancrage du sillon au substrat, ou un rôle de signalisation par la matrice ; en fin de cytocinèse, les intégrines repartent vers les extrémités des cellules filles au niveau des zones migratoires. Les auteurs montrent également que le routage des intégrines au site de clivage est effectué *via* la GTPase Rab21, essentielle pour la cytocinèse.

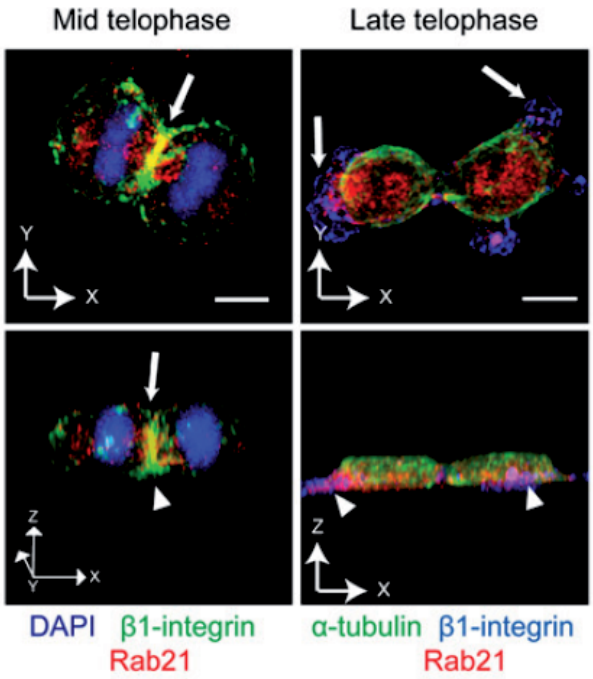


Figure 14 : Localisation de l'intégrine-β1 et Rab21 en cytocinèse
Immunomarquage de cellules NCI-H460 à différentes phases de la cytocinèse, code couleur indiqué sur la figure, reconstitutions selon les axes x-y ou x-z. Les flèches indiquent la colocalisation de Rab21 et de l'intégrine-β1, et les têtes de flèche montrent les intégrines proches du substrat. Echelle 10 µm. D'après (Pellinen et al., 2008).

II. Le pont intercellulaire

1. D'un point de vue historique

Walther Flemming

Walther Flemming, biologiste allemand de la seconde moitié du 19ème siècle, est considéré aujourd'hui comme le fondateur de la cytogénétique. Grâce à son travail d'amélioration des techniques de coloration, il met en évidence la chromatine et les chromosomes. Son article de 1882 (« Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung ») établit les bases de la division cellulaire, qu'il appelle « mitose ». Il décrit entre autre que chaque noyau provient d'un noyau père contenant exactement le même nombre de chromosomes. Vingt ans plus tard, les travaux de Mendel sur la théorie de l'hérédité révèlent toute l'importance des travaux de Flemming. Il est également le premier à reporter en 1891 (« Neue Beiträge zur Kenntniss der Zelle ») l'existence d'une structure corpusculaire formée à partir du fuseau mitotique avant la séparation des cellules filles. Il le nomme **« Mittelkörper » ou « midbody » en anglais, le corps central**. Aujourd'hui encore, la pièce centrale du pont intercellulaire est appelée « midbody » ou « Flemming body ».

En 1937, Henry Fry écrit un article intitulé « Studies of the mitotic figure – VI Mid-bodies and their significance for the central body problem », où il propose notamment que le midbody provienne des fibres du fuseau (« spindle fibers ») qui ont été pincées par l'anneau contractile de cytocinèse. Il faudra attendre les années 1950 pour que la technique de microscopie électronique permette d'accéder à l'ultrastructure du pont intercellulaire et du fameux midbody, reportée dans de nombreuses publications (Beams et al., 1950; Buck & Tisdale, 1962; Robbins & Gonatas, 1964; Krishan & Buck, 1965; Erlandson & de Harven, 1971). A cette époque également, Byers et Abramson observent en microscopie optique à contraste de phase des vagues de membrane plasmique au niveau du pont et proposent que ces vagues puissent être impliquées dans l'abscission (Byers & Abramson, 1968), même si on peut aujourd'hui se poser la question de la validité des résultats en voyant la morphologie des cellules en cytocinèse tardive (de nombreuses bulles au niveau de la membrane appelées « blebs », souvent associées à une souffrance cellulaire, Figure 15).

En 1977, Mullins et Biesele sont les premiers à décrire une évolution du pont au cours du temps grâce à une étude en microscopie électronique très minutieuse (J. M. Mullins & Biesele, 1977). Ils montrent une première phase au cours de laquelle le pont mesure en diamètre 1,5 à 2 µm, puis une phase d'amincissement du pont jusqu'à atteindre 200 nm de diamètre. Ils proposent alors que le pont est finalement cassé lorsque les cellules filles tirent dessus. Ils décrivent également la présence de segments plus étroits au niveau desquels la

membrane plasmique forme des rides à intervalles réguliers. Plus de 30 ans plus tard, Guizetti et collaborateurs expliquent enfin la formation de ces rides par l'assemblage de structures hélicoïdales nécessaires à l'abscission (Guizetti et al., 2011). Après l'étude de Mullins et Biesele, peu de choses sont comprises sur le mécanisme de l'abscission avant les années 2000, les chercheurs s'étant plutôt concentrés sur l'étude du début de la cytocinèse. A partir de 2004, plusieurs études utilisent une approche de criblage à haut débit afin de mieux comprendre la régulation de la cytocinèse dans son ensemble. Même si ces dernières années ont apporté beaucoup de réponses sur le mécanisme d'abscission en proposant différents modèles (décrits plus loin), la régulation de l'abscission dans l'espace et dans le temps reste encore largement incomprise.

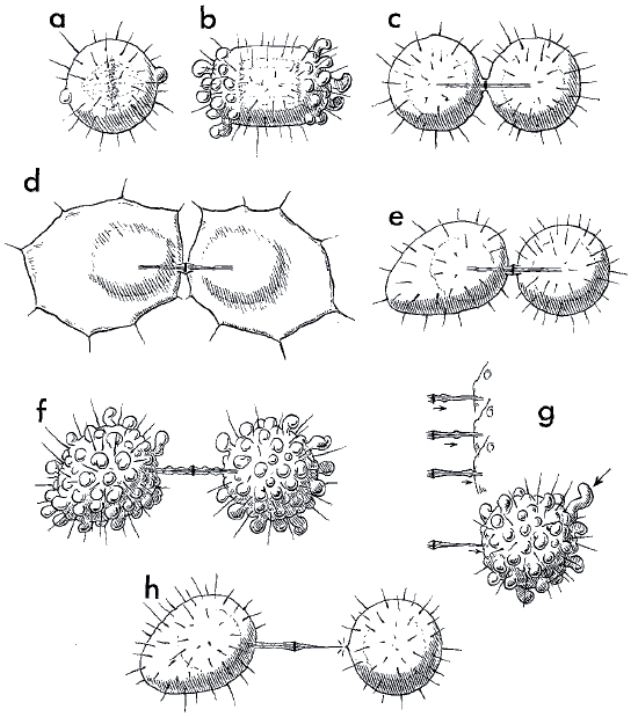


Figure 15 : La cytocinèse vue par Byers et Abramson en 1968
Représentation schématique des expériences de « microcinématographie » en contraste de phase. Après la télophase, les auteurs observent un second arrondissement alors que les cellules filles sont encore connectées par le pont intercellulaire (e). S'en suit une phase de dynamique intense de la membrane, produisant des blebs corticaux et des vagues au niveau du pont. L'abscission a finalement lieu une fois que les microtubules ont été retirés du pont (h). Tiré de (Byers & Abramson, 1968).

2. Les constituants du pont

L'observation en microscopie électronique du pont intercellulaire met en évidence une structure stéréotypée comprenant de nombreux faisceaux de microtubules parallèles et une pièce centrale, appelée le « midbody », qui apparaît comme une structure très foncée et très dense (Figure 16). De nombreuses vésicules sont également présentes dans le pont. Malgré sa structure très compacte, **le pont intercellulaire permet le passage de molécules d'une**

cellule fille à l'autre (Schulze & Blose, 1984). Cette propriété est même utilisée pour déterminer si le pont est encore intact (passage permis) ou s'il s'est coupé (passage impossible) (J. M. Sanger et al., 1985; Steigemann et al., 2009).

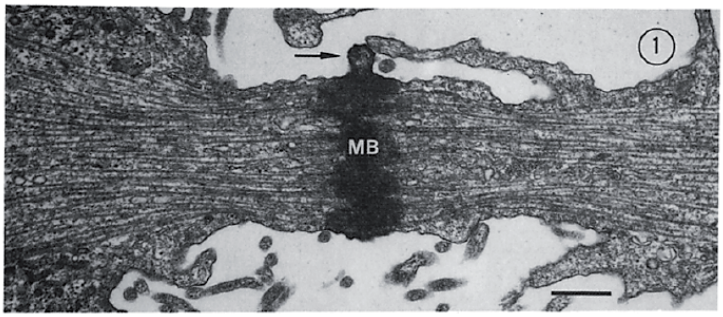


Figure 16 : Ultrastructure du pont intercellulaire
Image en microscopie électronique à transmission d'un pont intercellulaire en cytocinèse. Echelle 0,5 µm. D'après (J. M. Mullins & Biesele, 1977).

Dans les années 1980, les premières tentatives de caractérisation de la composition du pont intercellulaire et du midbody utilisent une technique de purification biochimique des ponts. En effet, les ponts étant plus stables que les corps cellulaires, ils peuvent être purifiés suite à une dégradation douce des corps cellulaires. L'analyse par électrophorèse 2D (Krystal et al., 1978) ou par SDS-PAGE (I. M. Mullins & Mclntosh, 1982) montre alors que le pont est majoritairement constitué de microtubules, mais aussi d'actine et d'autres composants alors encore inconnus. Ce chapitre donne une vue d'ensemble des constituants du pont tels qu'on les connaît aujourd'hui.

a. La membrane plasmique

La cytocinèse s'accompagne d'une très forte polarité des composants cellulaires, à la fois cytoplasmiques, corticaux et membranaires. La composition en lipides de la membrane plasmique est très spécifique au niveau du sillon de division et du pont intercellulaire. L'enrichissement en **cholestérol** et en **sphingolipide GM1** au niveau du sillon (Ng et al., 2005) est essentiel à la cytocinèse. Généralement, les domaines riches en cholestérols sont impliqués dans la signalisation *via* la protéine Src (Sarcoma), et il a justement été montré que Src est impliquée dans l'abscission (Kasahara et al., 2007). La répartition du **phospholipide PE** (phosphatidylethanolamine) est également fortement modifiée lors de la cytocinèse. En interphase, le PE est localisé sur le feuillet interne de la membrane plasmique, alors qu'il est localisé au feuillet externe au niveau du sillon de division et du pont intercellulaire (Kazuo Emoto & Masato Umeda, 2000). La diminution du taux de PE ou son immobilisation sur le feuillet externe entraîne des défauts d'abscission (Kazuo Emoto & Masato Umeda, 2000; K Emoto et al., 2005).

Comme décrit précédemment, les **phosphoinositides (PI)** sont également répartis de façon inégale lors de la cytocinèse. L'accumulation de PIP2 au pont intercellulaire est essentielle pour la stabilité du pont en début de cytocinèse (Kouranti et al., 2006). En effet, le PIP2 régule la dynamique du cytosquelette d'actine *via* le complexe Arp2/3, maintenant un niveau d'actine suffisant au pont intercellulaire pour assurer sa stabilité. Le PIP2 est également important pour le recrutement et l'activation de la Moesine (Roubinet et al., 2011) au niveau du pont. Le dernier paragraphe de ce chapitre aborde en détail ces aspects de stabilité du pont.

Comment ces domaines lipidiques sont-ils générés et maintenus au cours de la cytocinèse ? Plusieurs hypothèses peuvent répondre à cette question. Tout d'abord, le trafic vésiculaire peut, au moyen d'une sécrétion dirigée vers le midbody, enrichir la membrane plasmique du pont en lipides spécialisés par fusion des vésicules. Une seconde hypothèse est la production locale de lipides grâce à l'enrichissement au niveau du pont d'enzymes ou de facteurs de régulation de la synthèse des lipides. Cet enrichissement local peut se faire soit par trafic vésiculaire dirigé, soit par transport *via* les microtubules. Enfin, des barrières de diffusion, mises en place par exemple par les septines, pourraient empêcher la diffusion de lipides au sein de la membrane plasmique, formant ainsi des domaines spécialisés. Un principe similaire a été montré chez la levure bourgeonnante pour la spécialisation de la membrane du bourgeon par rapport à la membrane de la cellule mère (Dobbelaere & Barral, 2004). Pour une revue sur les barrières de diffusion dans les cellules eucaryotes, voir (Caudron & Barral, 2009).

b. L'actine

Au début de la cytocinèse, l'anneau contractile acto-myosique se contracte suite à l'activation de RhoA au niveau de la zone équatoriale de la cellule. L'actine joue alors un rôle important pour la mise en place et la stabilisation du pont intercellulaire (voir paragraphe ci-après). En revanche, une fois le pont formé, **l'anneau contractile se désassemble et l'actine disparait du pont** (Fujiwara et al., 1978). En effet, le traitement à la Latrunculine A (un inhibiteur de l'assemblage d'actine) ne déstabilise pas le pont s'il est effectué après l'ingression du sillon (Echard et al., 2004). Il a été montré récemment que la diminution d'actine dans le pont est essentielle pour l'abscission (Dambournet et al., 2011). La GTPase Rab35 est nécessaire pour la localisation et l'activation de la protéine OCRL au pont. OCRL, phosphatase du PIP2, dégrade le PIP2 présent au niveau du pont, ce qui diminue alors l'activité du complexe Arp2/3 et diminue ainsi la quantité d'actine dans le pont. La déplétion par siRNA de OCRL induit un retard ou une inhibition complète de l'abscission avec une accumulation d'actine dans le pont, le traitement à la Latrunculine A rétablissant une abscission normale.

Plusieurs études s'accordent pour montrer que **RhoA doit également être désactivée** pour permettre l'abscission :

- L'expression d'un mutant constitutivement actif de RhoA inhibe l'abscission (Morin et al., 2009).

- Le maintien de RhoA active par immobilisation du phospholipide PE au feuillet externe de la membrane plasmique bloque l'abscission (K Emoto et al., 2005). En effet, RhoA active recrute la phosphatase PI5K au pont, conduisant à la synthèse de PIP2 et bloquant l'abscission (probablement par accumulation d'actine au pont puisque PIP2 maintient le réseau d'actine).

- La surexpression de ECT2, activatrice de RhoA, inhibe également l'abscission (Chalamalasetty et al., 2006). Les auteurs de cette étude proposent que ECT2 doive quitter le pont après sa formation et repartir dans les noyaux fils pour permettre la fin de la cytocinèse.

- En début de cytocinèse, la protéine ECT2 interagit avec le complexe Centralspindlin (MgcRacGAP et MKLP1) pour former le sillon d'ingression. Etonnamment, le site d'interaction entre MgcRacGAP et ECT2 est également le site d'interaction entre MgcRacGAP et la protéine FIP3 impliquée dans la régulation des endosomes de recyclage. Ainsi, après l'ingression du sillon, la compétition entre ECT2 et FIP3 pour MgcRacGAP conduit à la libération de ECT2 par MgcRacGAP qui se lie majoritairement à FIP3, permettant le départ de ECT2 du pont et la localisation de FIP3 au midbody. FIP3 est nécessaire à l'abscission, et la dissociation de ECT2 du pont est nécessaire pour le routage de FIP3 au midbody (Simon et al., 2008). Ainsi, le départ de ECT2 du pont et donc l'inactivation de RhoA sont nécessaires au bon déroulement de l'abscission.

Pourquoi l'actine doit-elle disparaître du pont pour permettre l'abscission ? En effet, on pourrait penser à première vue que la machinerie acto-myosique mise en place pour la contraction de l'anneau au début de la cytocinèse pourrait également couper le pont intercellulaire lors de l'abscission. Mais, étant donné que l'abscission nécessite l'inactivation de RhoA et la diminution d'actine dans le pont, la machinerie impliquée lors de l'abscission n'est manifestement pas basée sur un réseau d'actine et de myosine comme dans l'anneau contractile. Il est possible alors que l'actine soit nécessaire pour les premières phases de la formation du pont, pour à la fois maintenir la stabilité du pont tant qu'il n'est pas définitivement formé et à la fois comprimer au maximum les composants du fuseau central pour aboutir à un pont intercellulaire le plus fin possible. Par la suite, une autre machinerie, spécialisée dans la réalisation de l'abscission, prendrait le relai de ce réseau acto-myosique pour couper le pont. Il devient alors essentiel de débarrasser le pont du maximum de ses constituants afin de faciliter sa coupure. Ainsi, l'actine, mais aussi tous les constituants qui assurent la stabilité du pont, doivent repartir de celui-ci pour permettre son abscission.

c. Les microtubules

Le pont intercellulaire est majoritairement constitué de microtubules (voir l'image en microscopie électronique Figure 16). Ces microtubules proviennent du **fuseau central** formé en anaphase qui est pincé par l'anneau contractile en début de cytocinèse. Ils sont organisés en faisceaux parallèles émanant de chacune des deux cellules filles et se chevauchant au niveau de la pièce centrale ou midbody. Leurs bouts « moins » se situent dans les corps cellulaires des cellules filles et leurs bouts « plus » sont dirigés vers le midbody. Une étude en cryomicroscopie électronique associée à de la tomographie a montré que la plupart des microtubules provenant des cellules filles traversent le midbody en ne laissant dépasser que leurs bouts « plus » de l'autre côté du midbody (Elad et al., 2011). D'autres microtubules traversent complètement le midbody, reliant les cellules filles de part en part. La protéine **PRC1** est localisée au niveau du midbody et permet d'associer fortement les microtubules anti-parallèles dans cette zone centrale du pont. Au cours du temps, le pont voit son diamètre diminuer par la réduction du nombre de microtubules (Figure 17), mais la structure globale des microtubules dans le pont est conservée jusqu'à l'abscission.

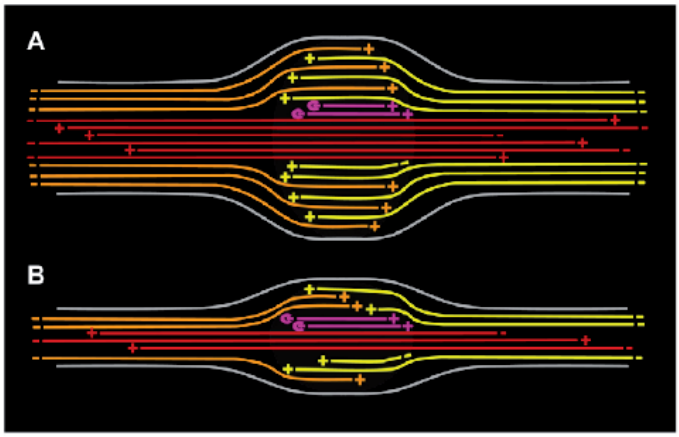


Figure 17 : Modèle de la structure des microtubules dans le pont intercellulaire
A) Stade précoce ; B) Stade plus tardif, après réduction du diamètre du pont. En orange les microtubules provenant de la cellule de gauche, en jaune les microtubules provenant de la cellule de droite, en rouge les microtubules traversant complètement le pont, et en violet les microtubules très courts nucléés dans la zone du midbody. D'après (Elad et al., 2011).

L'observation en dynamique de la protéine EB1 (End-Binding protein 1), protéine associée aux bouts « plus » des microtubules lors de la polymérisation, montre que les microtubules poussent depuis le corps cellulaire vers le midbody, mais également depuis le midbody vers la cellule (Rosa et al., 2006). Même si les microtubules ont cette activité de polymérisation, ils sont globalement **très stables**. En effet, ils sont fortement acétylés (Piperno et al., 1987), ce qui en général est associé à un caractère de stabilité, et ils sont résistants aux drogues dépolymérisantes (Steigemann et al., 2009). La **γ-tubuline** se localise aux extrémités du pont et sur les branches du pont de part et d'autre du midbody (Julian et al., 1993) et est

essentielle à la formation du pont. Des anticorps bloquants dirigés contre la γ-tubuline empêchent la cytocinèse (Shu et al., 1995). Les **centrosomes** sont également impliqués dans la cytocinèse, et notamment dans la régulation de l'abscission (M. Piel et al., 2001). Lors de la division, chaque cellule fille hérite d'un centrosome constitué d'un centriole père et d'un centriole fils. De façon étonnante, en cytocinèse les centrioles pères et fils se séparent, le centriole père quitte le centre de la cellule et se positionne à l'extrémité du pont intercellulaire ou même à l'intérieur du pont. L'abscission a lieu uniquement lorsque le centriole père repart du pont vers le centre de la cellule. De plus, l'abscission, qui se passe de part et d'autre du midbody, se fait en général en premier du côté où le centriole père est le plus proche du pont. Le rôle du centriole, et plus généralement des centrosomes, sur la régulation de l'abscission n'est pas encore parfaitement compris. Le centriole pourrait être à l'origine d'une voie de signalisation induite localement par sa position dans le pont qui inhiberait l'abscission, l'abscission n'étant autorisée que lorsque le centriole repart du pont. La position du centrosome pourrait également être le reflet d'un état particulier de la cellule : le mouvement retour du centriole père vers le centre de la cellule pourrait coïncider avec un état de réétalement ou de polarisation de la cellule qui autoriserait l'abscission. De plus, une étude postérieure a montré que la **Centrioline**, une protéine du centriole père, est requise pour l'abscission (Gromley et al., 2003). Elle est essentielle au routage des complexes Exocyst et des protéines SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor) vers le midbody (Gromley et al., 2005). Exocyst et SNARE sont au cœur de la régulation du trafic vésiculaire, et seront décrit dans un paragraphe ci-après.

Quelle est la fonction des microtubules du pont ? Plusieurs études montrent que les microtubules ne seraient pas impliqués *per se* dans le mécanisme d'abscission, mais plutôt qu'ils seraient limitants pour l'abscission, le pont devant être dégagé de tout composant pour que la fission de la membrane puisse avoir lieu. Cependant, les microtubules sont nécessaires à l'organisation du pont lors de la période précédant l'abscission. Ils pourraient notamment servir de support mécanique afin d'assurer l'intégrité du pont avant sa coupure, ou de structure permettant le routage des vésicules et des régulateurs essentiels à l'abscission. La dynamique des microtubules à l'intérieur du pont, et en particulier au niveau du midbody, demande encore à être clarifiée et sera abordée dans la partie Discussion.

d. Le midbody

Le midbody, structure centrale du pont intercellulaire, a suscité et suscite toujours beaucoup de questions concernant sa composition et sa fonction :

- Quelle est la composition de cette structure si dense ? En effet, en microscopie électronique, le midbody apparaît comme une masse noire au milieu de laquelle les microtubules du pont se chevauchent. Autre fait marquant, sa densité si forte empêche bien des anticorps de pénétrer pour obtenir un immunomarquage.

- Quel est son rôle lors de la cytocinèse et de l'abscission ?
- Quel est le devenir du midbody après la coupure du pont ?
- A-t-il un rôle après la coupure du pont ?
- Peut-on parler de division asymétrique en fonction du devenir du midbody ?

En 2004, une approche protéomique sur des ponts intercellulaires purifiés a permis d'identifier 577 protéines localisées au niveau du midbody (Skop et al., 2004). Parmi ces protéines, 169 sont impliquées dans la division. On retrouve notamment des protéines du trafic ou de la sécrétion vésiculaire, des protéines associées à l'actine ou aux microtubules, des kinases, et d'autres protéines plus difficiles à classifier. On trouve également beaucoup de protéines des mitochondries et des ribosomes, importantes pour les fonctions cellulaires de base mais pas spécialement impliquées dans la cytocinèse. En tant que structure centrale du pont intercellulaire, la midbody apparaît comme une **plateforme pour le recrutement de la machinerie d'abscission ainsi que pour sa régulation**. De plus, de nombreuses protéines impliquées dans la régulation de la division sont localisées en anaphase au niveau du fuseau central et naturellement transférées vers le midbody après contraction de l'anneau acto-myosique. Parmi celles-ci, on citera notamment la kinase AuroraB, dont le rôle dans l'abscission est essentiel (décrit en détail plus loin).

Lors de l'abscission, la coupure du pont intercellulaire s'effectue généralement de part et d'autre du midbody, laissant le midbody flotter entre les deux cellules filles. Il est alors soit ré-intégré par l'une des cellules filles, soit perdu dans le milieu intercellulaire. Lorsque le midbody est ré-intégré dans une cellule, il est ensuite dégradé par autophagie (Pohl & Jentsch, 2009). Certains facteurs d'autophagie, comme p62 ou Atg8 sont présents au niveau du midbody avant l'abscission, et suivent ensuite le midbody après l'abscission dans la cellule fille qui le récupère. On peut alors se demander si la division est vraiment symétrique ou si le midbody, recyclé dans une seule des deux cellules filles, peut jouer un rôle particulier, notamment de signalisation, et créer ainsi une asymétrie lors de la division.

Une étude récente montre que le **devenir du midbody** (ré-intégré par une cellule fille ou relâché dans le milieu) varie selon le type cellulaire (Ettinger et al., 2011). Les cellules souches auraient plus tendance à relâcher le midbody dans le milieu alors que les cellules cancéreuses auraient plus tendance à le ré-intégrer. Les auteurs montrent également que l'induction de la différenciation augmente la proportion de cellules qui relâchent le midbody. Ainsi, ils proposent que la relâche du midbody puisse être une caractéristique des cellules qui sont destinées à se différencier. Une autre étude montre que le midbody est accumulé dans les cellules souches alors qu'il est dégradé par autophagie dans les cellules en différenciation, et que l'accumulation de midbodies dans les cellules cancéreuses augmente leurs capacités tumorigènes (Kuo et al., 2011).

Deux exemples montrent que le midbody pourrait avoir un **rôle de signalisation** essentiel pour la morphogenèse embryonnaire. Les cellules neuroépithéliales sont les cellules souches du système nerveux central chez les mammifères. Ces cellules sont polarisées selon un axe apico-basal, et la position de l'axe de division détermine si la division sera symétrique (prolifération) ou asymétrique (vers une différenciation de l'une des deux cellules filles, l'autre conservant les caractéristiques d'une cellule souche). Lors des divisions symétriques, le pont intercellulaire se positionne du côté apical. Le midbody est ensuite relâché dans le milieu extracellulaire, assurant ainsi une division parfaitement symétrique puisqu'il n'est ré-intégré par aucune des deux cellules filles. De plus, le midbody concentre la protéine prominin-1, et son relargage pourrait jouer un rôle de signalisation intercellulaire (Dubreuil et al., 2007). Le midbody pourrait également avoir un rôle dans l'orientation du fuseau mitotique lors des premières divisions de l'embryon du nématode *Caenorhabditis elegans* (A. Hyman, 1989). Le midbody marquerait un territoire sur la membrane, il serait ensuite capturé par les microtubules lors de la division suivante et aiderait au positionnement du fuseau. Certaines protéines impliquées dans la rotation du fuseau sont présentes au niveau du midbody, comme Endophilin B1, HIP1/DUO, Copine I, et CLIP-170 (Skop et al., 2004).

e. Le trafic vésiculaire

Le trafic vésiculaire joue un rôle central et complexe dans le déroulement de la cytocinèse, et a longtemps été considéré comme la machinerie principale mise en œuvre lors de l'abscission (pour des revues, voir : (Echard, 2008; Simon & Prekeris, 2008; Montagnac et al., 2008)). En 1973, Bluemink et de Laat montrent que lors de la première division de l'embryon de Xénope, l'ingression du sillon de division s'accompagne d'un apport constant de membrane plasmique. Ils montrent que l'augmentation de surface de la membrane plasmique se fait par formation *de novo* de membrane et non par extension de la membrane existante. De nombreuses vésicules étant associées au sillon de division, ils proposent que la **nouvelle membrane soit apportée grâce à la fusion de ces vésicules** (Bluemink & de Laat, 1973). Lors de la cellularisation dans le développement précoce de l'embryon de Drosophile, l'apport de nouvelle membrane se fait à partir d'un réservoir cytoplasmique transporté *via* les microtubules (Lecuit & Wieschaus, 2000). Il est suggéré également que l'apport de membrane par le trafic vésiculaire soit impliqué dans la cytocinèse tardive (Shuster & D R Burgess, 2002).

Des **vagues de membrane** ont également été observées au niveau du pont intercellulaire (Byers & Abramson, 1968), témoignant d'un apport membranaire ou du moins d'une dynamique membranaire élevée au niveau du pont. Une étude récente a montré que ces vagues de membrane plasmique en cytocinèse tardive sont dépendantes du trafic des endosomes de recyclage régulé par **Rab11 et FIP3** (Schiel et al., 2011). La localisation de la GTPase Rab11 au midbody dépend de son interaction avec son effecteur FIP3, lui-même recruté au pont grâce à son interaction avec MgcRacGAP. La déplétion de FIP3 provoque une

régression du sillon de division ou un retard d'abscission (G. M. Wilson et al., 2005). Enfin, le complexe Rab11/FIP3 interagit avec la GTPase Arf6, qui a son tour se lie au complexe Exocyst pour permettre la fusion des vésicules (Fielding et al., 2005).

Le complexe octamérique **Exocyst** contrôle l'ancrage des vésicules à la membrane plasmique lors de la sécrétion par exocytose. A la suite de l'interaction initiale entre la vésicule et la membrane plasmique *via* le complexe Exocyst, les protéines de la famille **SNARE** permettent la fusion des membranes (B. He & Guo, 2009). Le complexe Exocyst et les SNAREs sont recrutés au niveau du pont intercellulaire grâce à la protéine **Centrioline**, et leur recrutement est indispensable au bon déroulement de l'abscission (Gromley et al., 2005). La Centrioline est elle-même recrutée au midbody grâce à l'activité kinase de la protéine **Mnk1** (MAP kinase interacting kinase 1, une kinase activée par la voie des MAP kinases), essentielle à l'abscission (Rannou et al., 2012). Le complexe Exocyst régule bon nombre de voies de trafic vésiculaire. Il régule notamment la voie des endosomes de recyclage grâce à l'interaction de sa sous-unité Exo70 avec FIP3 (Fielding et al., 2005). Les protéines de la famille **Ral** sont importantes pour la fonctionnalité du complexe Exocyst en cytocinèse. En effet, le complexe Exocyst spécifie le routage des vésicules vers le midbody *via* la protéine RalA (X.-W. Chen et al., 2006), et le recrutement du complexe Exocyst au midbody nécessite la protéine RalB, la déplétion de RalB entraînant un défaut d'abscission (Cascone et al., 2008). Les protéines SNARE Syntaxin 1, Syntaxin 2 et Vamp8 (ou Endobrevin) sont enrichies au midbody, et leur inhibition par expression d'un mutant à effet dominant négatif entraîne des défauts de cytocinèse (Low et al., 2003). La protéine **BRUCE** est également impliquée dans le routage des vésicules vers le midbody grâce à ses nombreux partenaires : le complexe Exocyst, Rab8, Rab11 et MKLP1. Elle sert de plateforme pour le système d'apport de membrane lors de la cytocinèse, et sa déplétion entraîne des défauts d'abscission (Pohl & Jentsch, 2008).

Le trafic vésiculaire régulé par la GTPase **Rab35** joue également un rôle essentiel. En début de cytocinèse, les vésicules régulées par Rab35 sont envoyées vers le midbody. Elles transportent de la **PI5K**, une kinase qui phosphoryle le PIP1 en PIP2, conduisant à la production locale de PIP2. Cette accumulation de PIP2 est alors impliquée dans la formation d'un réseau d'actine dense au niveau du pont, indispensable pour sa stabilité. En effet, la déplétion de Rab35 entraîne la régression du sillon de division (Kouranti et al., 2006). Rab35 est également impliquée dans la localisation de la septine SEPT2 au pont (Kouranti et al., 2006), participant probablement à la formation d'une barrière de diffusion et à la stabilisation du pont. En revanche, en fin de cytocinèse, les vésicules régulées par Rab35 délivrent au niveau du pont la phosphatase **OCRL** (Dambournet et al., 2011). Cette fois, OCRL déphosphoryle le PIP2, ce qui appauvrit la membrane du pont en PIP2 et permet la diminution d'actine dans le pont, indispensable pour l'abscission. Bien que le contrôle temporel du changement radical de fonction de Rab35 soit encore mal compris, il est clair que Rab35 a un rôle fondamental, à la fois en début et en fin de cytocinèse.

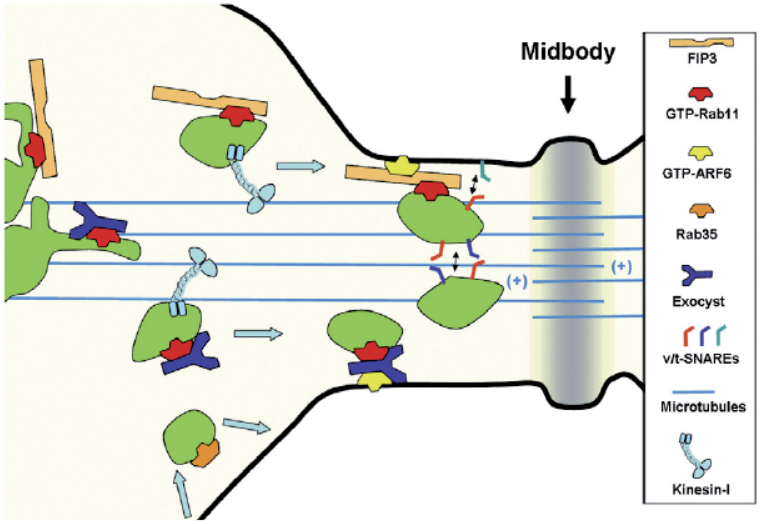


Figure 18 : Représentation schématique du trafic vésiculaire lors de la cytocinèse
Dans ce modèle, Rab11-GTP (forme active) interagit et recrute soit FIP3 soit le complexe Exocyst, dirigeant les vésicules vers le midbody. Le transport des vésicules vers les bouts « plus » des microtubules s'effectue *via* l'interaction avec la kinésine-1. Au niveau du midbody, les complexes Rab11/FIP3 et Rab11/Exocyst interagissent avec Arf6-GTP, permettant ainsi l'ancrage des vésicules à la membrane plasmique. Finalement, les SNARE assurent la fusion des membranes. Rab35 participe à la régulation du réseau d'actine en régulant le PIP2 à la membrane du pont intercellulaire. D'après (Montagnac et al., 2008).

f. Les ESCRT

Les ESCRT, ou « Endosomal Sorting Complex Required for Transport », constituent une famille de protéines très conservées au sein des organismes vivants. Ils ont d'abord été découverts dans la régulation du trafic vésiculaire des endosomes, d'où leur nom, mais sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires, et en particulier dans la fission membranaire. Ils sont classés en 5 grands groupes : ESCRT-0, I, II, III, et protéines de désassemblage. Constituants essentiels du pont intercellulaire, leur recrutement au midbody est présenté dans ce paragraphe. Ils seront décrits plus en détail par la suite dans le paragraphe consacré à la fission des membranes.

La protéine centrosomale **Cep55** (Centrosomal protein of 55 kDa) est à l'origine du recrutement des ESCRT au midbody. En interphase, Cep55 est localisée au centrosome. En cytocinèse, elle se localise au fuseau central puis au midbody *via* son interaction directe avec MKLP1 du complexe Centralspindlin (Zhao et al., 2006). Cep55 recrute ensuite **Tsg101** (une protéine des ESCRT-I) et **Alix** (une protéine associée aux ESCRT) (Jez G Carlton & Juan Martin-Serrano, 2007; Morita et al., 2007; Lee et al., 2008). Tsg101 et Alix recrutent à leur tour les **ESCRT-III**, comprenant notamment les protéines **CHMP** (Charged Multivesicular Body Proteins). **Vps4**, une AAA ATPase qui désassemble les complexes ESCRT-III pour aboutir à la fission de membrane, est également recrutée au midbody et est essentielle pour l'abscission (Morita et al., 2010). De façon générale, la déplétion ou la surexpression (par effet dominant négatif dû probablement à la perturbation de la dynamique d'assemblage et de désassemblage des complexes) d'un des composants du complexe ESCRT perturbe ou

inhibe l'abscission. En effet, les ESCRT-III recrutent au midbody la protéine Spastine (Yang et al., 2008), une enzyme impliquée dans la coupure des microtubules du pont, et permettent la fission de la membrane lors de l'abscission (Guizetti et al., 2011; Elia et al., 2011). Ils sont également impliqués dans la régulation dans le temps de l'abscission (Jeremy G Carlton, Anna Caballe, et al., 2012). Le rôle des ESCRT est abordé en détail dans le chapitre III de l'Introduction.

g. Stabilité du pont intercellulaire

Au début de la formation du pont, de nombreux composants permettent d'assurer la stabilité de celui-ci, c'est-à-dire de maintenir la cohésion entre la membrane plasmique, l'anneau contractile acto-myosique, et plus tard les microtubules du pont. En effet, la machinerie contractile se trouve à l'intérieur de la cellule et tire sur la membrane lors de l'ingression du sillon. Il est alors essentiel qu'elle soit très fortement associée à la membrane par une sorte de « glue moléculaire ».

L'**anilline** est une protéine structurale importante pour la formation et la stabilité du pont intercellulaire (Echard et al., 2004; Kechad et al., 2012). Elle interagit avec de nombreux partenaires, dont l'actine, la myosine-II, les microtubules, RhoA, les septines, la formine mDia2 et le PIP2 (A. J. Piekny & Maddox, 2010). La localisation de l'anilline au sillon de division nécessite l'activation de RhoA (A. J. Piekny & Glotzer, 2008) ainsi que l'interaction avec le PIP2 (J. Liu et al., 2012). Tout comme l'actine, l'anilline doit quitter le pont en cytocinèse tardive pour permettre l'abscission. En effet, la surexpression de l'anilline provoque des défauts d'abscission (Gai et al., 2011). La **supervilline**, une protéine similaire à l'anilline, pourrait également avoir un rôle structural important en cytocinèse (Smith et al., 2011).

La **Citron-K** (ou Citron-Kinase) est une kinase de la voie RhoA nécessaire à la cytocinèse (Gruneberg et al., 2006). Longtemps considérée comme effecteur de RhoA, une étude récente a montré que la Citron-K serait plutôt en amont de RhoA puisque la déplétion de RhoA n'empêche pas la localisation de Citron-K au midbody (Gai et al., 2011). La Citron-K est essentielle pour la localisation de l'anilline au pont, et la déplétion de la Citron-K conduit à une instabilité du pont qui se relâche, les deux cellules filles re-fusionnant. En revanche, une surexpression de Citron-K retarde l'abscission, probablement à cause d'une accumulation de RhoA active et de l'anilline au pont, empêchant l'abscission.

Les **septines** sont également très importantes pour la stabilité du pont. Ces GTPases sont groupées en 4 classes, le nom de la classe correspondant au nom de la septine fondatrice de la classe : SEPT2, SEPT3, SEPT6, SEPT7. Elles s'associent en oligomères hétéromériques puis en filaments ou en anneaux. Chaque unité oligomérique comporte 3 ou 4 septines, une de chaque classe, ce trimère ou quadrimère étant répété en miroir, par exemple SEPT7-SEPT6-SEPT2-SEPT2-SEP6-SEPT7. Les septines sont considérées comme la quatrième classe du

cytosquelette, après l'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Elles peuvent avoir des rôles d'échafaudage moléculaire (en cytocinèse, lors de la régulation des protéines membranaires, ou pour conférer de la rigidité aux cellules), ou des rôles de barrière de diffusion (au cou de la levure bourgeonnante, au niveau du début de la queue du spermatozoïde, ou à la base du cil primaire). Elles interagissent avec l'actine, les microtubules, les phospholipides et l'anilline (pour une revue voir (Mostowy & Cossart, 2012). Les septines sont des composants essentiels à la cytocinèse : la déplétion de SEPT2, SEPT7 et SEPT11 induit des défauts d'ingression du sillon, alors que la déplétion de **SEPT9** provoque un défaut d'abscission (Estey et al., 2010). SEPT9 est impliquée dans l'assemblage des septines en structures complexes, comme les anneaux ou les filaments. Seule son activité d'assemblage est requise pour l'abscission, laissant penser que les septines pourraient intervenir en tant qu'assemblage supra-moléculaire au moment de l'abscission (Kim et al., 2011). Les septines interagissent également avec certaines protéines du transport vésiculaire comme le complexe Exocyst ou les syntaxines. Les septines pourraient alors jouer un rôle de barrière de diffusion en autorisant la fusion des vésicules uniquement à un endroit précis, près du midbody (Joo et al., 2005). La Figure 19 schématise les étapes de stabilisation du pont intercellulaire.

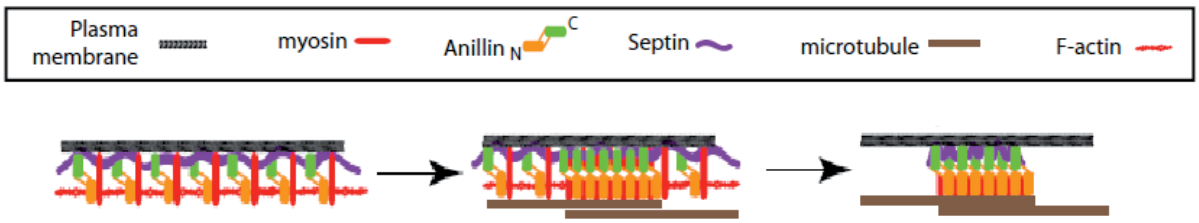


Figure 19 : Stabilisation du pont intercellulaire et du midbody
Au début de la formation du pont intercellulaire (à gauche), les septines et l'anilline assurent le lien entre la membrane plasmique et l'anneau acto-myosique. A la fin de l'ingression du sillon (au milieu), les septines et l'anilline interagissent également avec les microtubules du pont. Finalement (à droite), les composants du pont se condensent pour former le midbody, structure centrale du pont dépourvue d'actine. Adapté de (Kechad et al., 2012).

Les protéines ERM (Erzin Radixin Moesin) sont des protéines structurales qui font le lien entre la membrane plasmique (grâce à leur domaine FERM se liant au PIP2) et le cytosquelette d'actine (grâce à leur domaine C-ERMAD se liant à l'actine). Ces protéines sont présentes dans le cytoplasme sous forme inhibée, où les domaines FERM et C-ERMAD sont liés entre eux. L'activation des ERM requiert deux choses : la phosphorylation du domaine C-ERMAD par une kinase régulatrice, et l'interaction du domaine FERM avec le PIP2. Il a été montré que la **Moesine** est importante pour le remodelage du cortex de la cellule en cytocinèse (Carreno et al., 2006).

L'**actine** a également un rôle de stabilisateur du pont. Comme décrit précédemment, le trafic régulé par Rab35 apporte de la kinase PI5K au niveau du pont, enrichissant ainsi le pont en

PIP2. Ceci est essentiel pour la formation d'un réseau d'actine dense qui stabilise le pont lors de sa formation (Kouranti et al., 2006). De plus, il a été montré que l'actine joue un rôle de stabilisation mécanique du pont lors d'un défaut de ségrégation d'ADN. En effet, la présence d'ADN dans le pont retarde l'abscission (décrit plus loin), le pont étant stabilisé par une accumulation d'actine qui maintient le pont en place même après le désassemblage des microtubules du pont (Steigemann et al., 2009).

Il est donc essentiel que le pont soit stabilisé lors de sa formation afin d'éviter qu'il ne se relâche et que les cellules filles re-fusionnent. En revanche, il est également important que ces éléments structuraux quittent le pont afin de permettre l'abscission de celui-ci. Une bonne coordination dans le temps est alors nécessaire pour d'abord recruter les stabilisateurs au début de la cytocinèse, puis ensuite seulement les dégrader ou les retirer. La transition entre ces deux phases reste encore mal comprise et constitue l'un des défis des travaux futurs.

III. La coupure du pont intercellulaire : l'abscission

En biologie, le terme « abscission » est utilisé à l'origine pour désigner le processus par lequel une plante détache une ou plusieurs parties d'elle-même, comme les feuilles, les fruits, les fleurs ou les graines. Il est utilisé également en biologie animale pour décrire la coupure volontaire d'une partie du corps animal, comme la queue du lézard qui se coupe lorsqu'elle est attrapée par un prédateur. On parle aussi d'abscission en biologie cellulaire en référence à la terminaison de la cytocinèse, l'abscission étant le moment où les deux cellules filles sont définitivement séparées. Dans ce contexte, l'abscission consiste en la coupure du pont intercellulaire reliant les deux cellules filles à la suite de la contraction de l'anneau acto-myosique. Une fois le pont débarrassé de l'actine et de ses composants stabilisateurs, deux étapes sont encore nécessaires à sa coupure : **i) la coupure des microtubules, et ii) la fission de la membrane plasmique**. Ces deux aspects sont abordés au début de ce chapitre. Aujourd'hui, plusieurs modèles sont proposés pour expliquer le mécanisme d'abscission. En effet, comme l'actine quitte le pont avant l'abscission, il est fort peu probable que l'abscission utilise la même machinerie que l'anneau contractile du début de la cytocinèse ; elle reposerait plutôt sur une machinerie spécialisée dans la coupure de ce pont. Ces **différents modèles** sont présentés dans la suite de ce chapitre. Finalement, quelques exemples connus de la **régulation dans le temps** de l'abscission sont décrits à la fin de ce chapitre.

1. La coupure des microtubules

Comme tous les constituants du pont, les microtubules doivent être retirés du pont pour permettre l'abscission (Byers & Abramson, 1968), la fission de la membrane plasmique ne pouvant avoir lieu s'il reste des microtubules dans le pont. Guizetti et collaborateurs proposent que la **coupure des microtubules soit le facteur limitant de l'abscission** puisque dans la plupart des cellules en culture *in vitro* observées jusqu'à maintenant, la fission de la membrane est quasiment concomitante avec la coupure des microtubules, et que le traitement par une drogue qui dépolymérise les microtubules peut accélérer l'abscission (Guizetti et al., 2011).

Plusieurs observations laissent penser que la coupure des microtubules pourrait être effectuée par **l'action d'enzymes de coupure des microtubules et non par désassemblage**. Tout d'abord, les travaux de Steigemann et collaborateurs montrent que les microtubules, coupés de part et d'autre du midbody, sont coupés d'une manière très nette, ressemblant plus à une coupure suite à l'action d'enzymes plutôt qu'à un désassemblage (Steigemann et al., 2009). Ensuite, la zone de chevauchement des microtubules au niveau du midbody est conservée même après l'abscission, signe que les microtubules ont été coupés en leur milieu et non complètement désassemblés (Guizetti et al., 2011). Finalement, la déplétion par

siRNA de la Spastine, une enzyme de coupure des microtubules, retarde considérablement l'abscission (Connell et al., 2009).

a. Les enzymes de coupure des microtubules

La famille des enzymes de coupure des microtubules (ou « microtubule-severing enzymes » en anglais) comporte 3 protéines : la **Katanine**, la **Spastine** et la **Fidgetine** (pour une revue voir (Sharp & Ross, 2012)). Leur caractéristique est de générer une cassure du microtubule en son milieu, contrairement aux protéines associées aux microtubules qui favorisent la dépolymérisation à partir des extrémités. Ces enzymes sont de la famille des AAA ATPases : elles utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour leur activité de coupure des microtubules. Elles sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires, comme la formation du fuseau en mitose et en méiose, la biogenèse des cils, la déflagellation, la neurogenèse ou encore la migration cellulaire.

La Katanine a été purifiée pour la première fois en 1993 à partir d'œufs d'oursin (McNally & R D Vale, 1993). C'est alors la première protéine décrite comme une enzyme capable de couper les microtubules. La Spastine tient son nom de son implication dans la maladie neurodégénérative autosomale dominante HSP (hereditary spastic paraplegia). En effet, une mutation du gène SPG4 a été identifiée comme cause majeure du développement de cette maladie (Hazan et al., 1999). Le rôle de la Spastine sur la dynamique des microtubules n'a été identifié que plus tard, sa forte similarité avec la Katanine laissant supposer une activité de coupure des microtubules (Errico et al., 2002).

Des études structurales, sur la Spastine en particulier, ont permis de mieux comprendre le mode de fonctionnement de cette famille d'enzymes. La Spastine, sous forme monomérique dans le cytoplasme, s'assemble en **hexamère** fonctionnel en formant un **pore central** qui contient l'activité ATPase et des bras sur le côté pour se lier au microtubule (Figure 20A). Le mécanisme de coupure proposé est le suivant : l'hexamère s'associe sur le côté du microtubule et tire dans son pore central l'extrémité C-terminale de la tubuline qui ressort du microtubule (Figure 20B). L'attachement du monomère de tubuline avec ses voisins est alors déstabilisé, ce qui déstabilise la structure globale du microtubule et conduit à sa cassure (Roll-Mecak & Ronald D Vale, 2008). Il s'agit d'une coupure réversible (seule la structure du microtubule est perturbée), les monomères restant intacts et pouvant se ré-associer pour former à nouveau un microtubule.

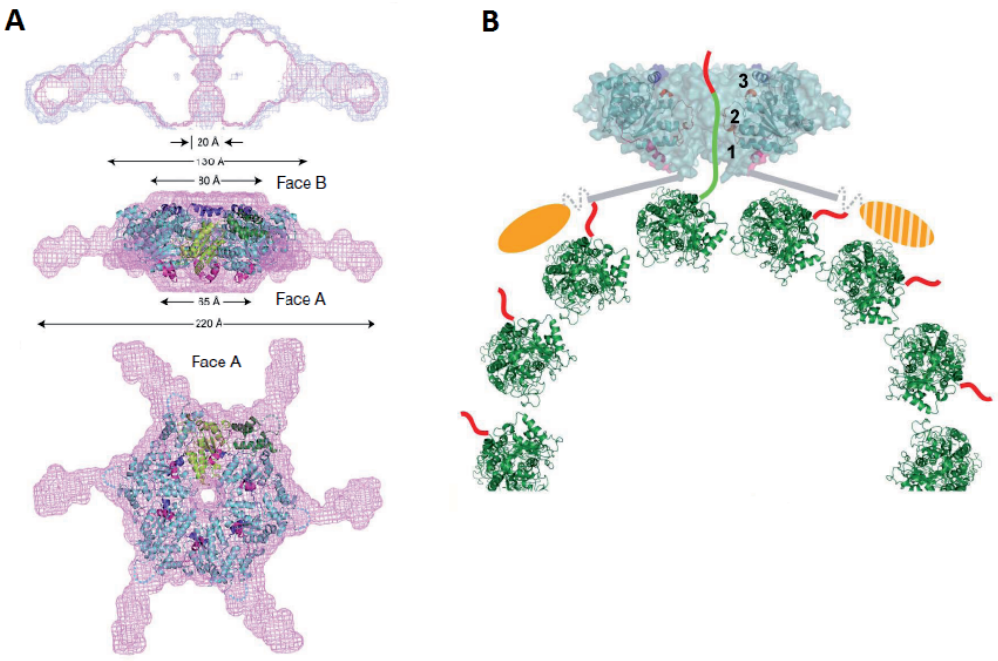


Figure 20 : Structure et mode d'action de la Spastine

A) Structure du complexe hexamérique de la Spastine vu de profil (haut et milieu) et de dessus (bas). On observe clairement le pore central et les bras dirigés vers l'extérieur du complexe. B) Modèle proposé pour l'action de la Spastine sur le microtubule. Le cœur ATPasique est représenté en bleu cyan, le pore central au milieu. Les domaines MIT sont représentés par des ovales oranges. Les hétérodimères de tubuline α et β sont représentés par des rubans verts et la chaîne C-terminale de la tubuline est représentée en rouge. Adapté de (Roll-Mecak & Ronald D Vale, 2008).

b. La Spastine : localisation en cytocinèse et régulation de son activité par la polyglutamylation

En cytocinèse, la Spastine est recrutée au midbody *via* son interaction avec **CHMP1B**, un composant des complexes ESCRT. En effet, le domaine MIT (Microtubule Interacting and Transport) de la Spastine interagit directement avec l'extrémité C-terminale de CHMP1B (Yang et al., 2008). La déplétion de la Spastine induit un fort retard de la coupure des microtubules et donc de l'abscission (Connell et al., 2009). Ainsi, la coupure des microtubules du pont par la Spastine pourrait être liée au trafic des ESCRT dans le pont (Figure 21).

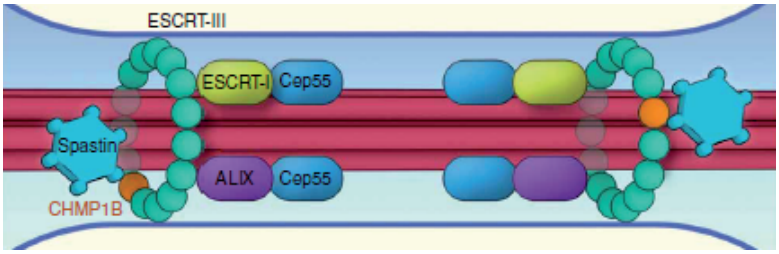


Figure 21 : Modèle pour le recrutement de la Spastine au midbody
La protéine centrosomale Cep55, localisée au pont par son interaction avec le complexe Centralspindlin, recrute les protéines Tsg101 (ESCRT-I) et Alix, qui vont ensuite recruter les ESCRT-III dont CHMP1B. L'interaction entre CHMP1B et la Spastine localise la Spastine au pont intercellulaire. D'après (Yang et al., 2008).

Dans ce contexte, la régulation de la coupure des microtubules du pont pourrait provenir soit d'une régulation de la localisation de la Spastine, soit de la régulation de l'activité de la Spastine. Pour le moment, un seul mode de régulation de l'activité de la Spastine a été décrit ; il s'agit d'une régulation *via* les **modifications post-traductionnelles des microtubules**. Dans les cellules, les chaînes latérales de tubuline dépassant des microtubules peuvent être modifiées de nombreuses façons : détyrosination, glutamylation, glycylation, acétylation, phosphorylation, ou palmitoylation. Etant donné que ces chaînes de tubuline constituent souvent le site d'interaction entre le microtubule et d'autres protéines, les modifications de ces chaînes latérales peuvent influencer fortement l'interaction entre le microtubule et les protéines associées au microtubule (MAPs), les enzymes de coupure, les moteurs moléculaires ou les protéines associées aux bouts « plus » (Figure 22). Généralement, on retrouve un taux plus important de modifications sur les microtubules stables que sur les microtubules dynamiques, soit parce que les microtubules stabilisés sont accessibles plus longtemps aux enzymes de modification, soit parce que les modifications stabilisent les microtubules en empêchant l'association de protéines favorisant la dépolymérisation du microtubule.

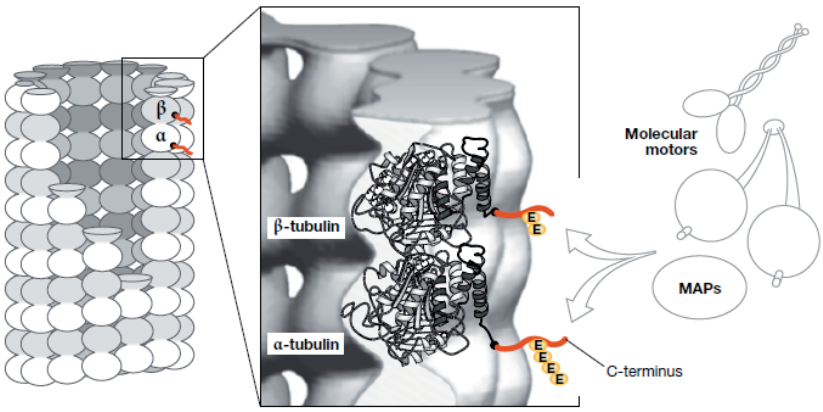


Figure 22 : Modifications post-traductionnelles des microtubules
Sur la gauche, représentation schématique du microtubule avec association des dimères de α et β tubuline ; les extrémités C-terminales de la tubuline sont représentées en rouge, sur le côté du microtubule. Au milieu, la structure du dimère de α et β est représentée au sein du microtubule. Les extrémités C-terminales des chaînes latérales de tubuline sont modifiées ici par polyglutamylation (ajout de résidus glutamates notés « E »). Les extrémités C-terminales de la tubuline sont également les sites d'interaction de nombreux moteurs et MAPs ; les modifications post-traductionnelles pourraient alors réguler l'interaction entre le microtubule et les protéines s'y associant. D'après (Janke et al., 2008).

Parmi ces modifications, les **glutamylations** ou **polyglutamylations** (ajout de un ou plusieurs résidus glutamates sur la chaîne latérale de la tubuline) méritent particulièrement d'être décrites puisqu'elles **modulent l'activité de la Spastine**. La grande famille des TTLLs (tubulin tyrosine ligase-like) regroupe les différentes enzymes catalysant les réactions de polyglutamylation (Janke et al., 2008). En fonction du site de la réaction (sur la tubuline-α ou β) et du type de modification (initiation de la glutamylation ou élongation d'une chaîne déjà existante), les réactions sont catalysées par des enzymes très spécialisées. D'autres enzymes permettent au contraire d'enlever ces chaînes de polyglutamylation. Il a été montré que l'activité de la Spastine est influencée par la polyglutamylation des microtubules, en particulier les chaînes longues de glutamates : la **polyglutamylation en chaîne longue augmente l'activité de coupure de la Spastine**, à la fois *in vivo* (cellules HeLa) et *in vitro* (Benjamin Lacroix et al., 2010). De façon intéressante, cette étude montre également que les **microtubules du pont intercellulaire sont polyglutamylés avec des chaînes longues de glutamates** (Figure 23). Ainsi, l'activité de la Spastine, et donc l'abscission, pourraient être régulées en amont par les enzymes de modification des microtubules : un faible taux de polyglutamylation induirait une faible activité de la Spastine et retarderait la coupure des microtubules et donc l'abscission ; un fort taux de polyglutamylation induirait une forte activité de la Spastine, qui entraînerait alors la coupure des microtubules du pont puis l'abscission. Il serait intéressant d'étudier si la polyglutamylation des microtubules du pont varie au court du temps, et notamment si une augmentation de la polyglutamylation a lieu au moment de l'abscission, ou si une diminution de la polyglutamylation est observée lorsque l'abscission est retardée. Un projet visant à étudier le rôle des différentes enzymes de polyglutamylation et de déglutamylation a d'ailleurs été initié au laboratoire en collaboration avec Carsten Janke, chercheur à l'Institut Curie et spécialiste de ces enzymes.

Même si d'autres travaux sont encore nécessaires à l'aboutissement de ce projet, j'ai eu l'occasion d'encadrer pendant 2 mois une étudiante de Master 1 sur ce sujet et de transférer certaines techniques de vidéomicroscopie à l'équipe de Carsten Janke pour que le projet puisse être poursuivi.

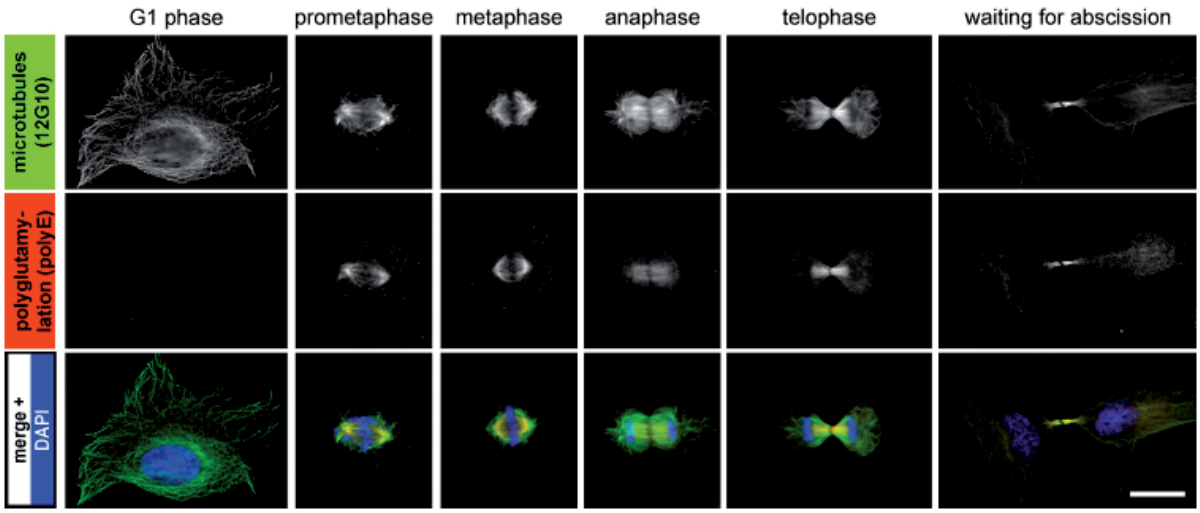


Figure 23 : Localisation des polyglutamylations en chaîne longue pendant la division cellulaire
Immunomarquage de cellules HeLa à différents stades de la division cellulaire. En haut, anticorps dirigé contre les microtubules ; au milieu anticorps dirigé contre les chaînes longues de polyglutamylation ; en bas superposition des différentes couleurs avec en vert les microtubules, en rouge les polyglutamylations et en bleu l'ADN. On remarque notamment que les microtubules du pont intercellulaire sont nettement modifiés par de longues chaînes de polyglutamylation. D'après (Benjamin Lacroix et al., 2010).

c. D'autres modes de coupure des microtubules lors de l'abscission

La **Katanine**, enzyme de coupure des microtubules, est également présente au niveau du pont intercellulaire et pourrait éventuellement être impliquée dans la coupure des microtubules lors de l'abscission. En effet, sa localisation dépend de son interaction avec la protéine LAPSER1. La localisation au midbody de la Katanine et de LAPSER1 dépendent toutes deux de MKLP1 et sont nécessaires au bon déroulement de la cytocinèse (Sudo & Maru, 2007). L'activité de la Katanine est régulée par la protéine Tau (essentiellement au niveau des neurones, Tau protège les microtubules de la coupure par la Katanine) et par l'acétylation des microtubules qui augmente la sensibilité à la coupure par la Katanine (Sudo & Baas, 2010). Etant donné que les microtubules du pont sont fortement acétylés, il se pourrait que la Katanine soit activée au niveau du pont et coupe les microtubules lors de l'abscission. Cependant, il semblerait que la Katanine soit moins importante pour l'abscission que la Spastine. Elle pourrait jouer un rôle mineur par rapport à la Spastine, ou prendre le relai de la Spastine lorsque celle-ci est mal localisée au pont ou inactivée. En effet, lors d'une déplétion de la Spastine par siRNA, la coupure nette des microtubules est inhibée mais l'abscission est uniquement retardée et non complètement inhibée. Il est alors très probable

qu'un autre mécanisme permette la disparition des microtubules du pont nécessaire à l'abscission. Une déplétion de ces deux enzymes (double siRNA Spastin et Katanine) pourrait permettre de mieux comprendre l'implication de ces protéines dans la coupure des microtubules du pont.

La **courbure des microtubules** pourrait également être responsable de leur désassemblage avant l'abscission. En effet, *in vivo* les microtubules cassent plus facilement lorsqu'ils sont courbés que lorsqu'ils sont droits (Waterman-Storer & Salmon, 1997), alors qu'ils sont capables de pousser contre une barrière physique et de se courber sans se casser *in vitro* (Janson et al., 2003). Une autre étude montre que dans les fibroblastes, le taux de cassure des microtubules augmente lorsque ceux-ci sont courbés (Odde et al., 1999). Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cet effet de la courbure du polymère (Figure 24) : i) diminution de l'affinité de MAPs stabilisatrices ; ii) facilitation de l'association d'enzymes de coupure des microtubules ; iii) facilitation de la dissociation des dimères de tubuline par déstabilisation du polymère. Les trois modèles ne sont pas mutuellement exclusifs, par exemple la dissociation des MAPs protectrices pourrait aider les enzymes de coupure à s'associer au microtubule, et ces enzymes pourraient à leur tour déstabiliser la structure du polymère.

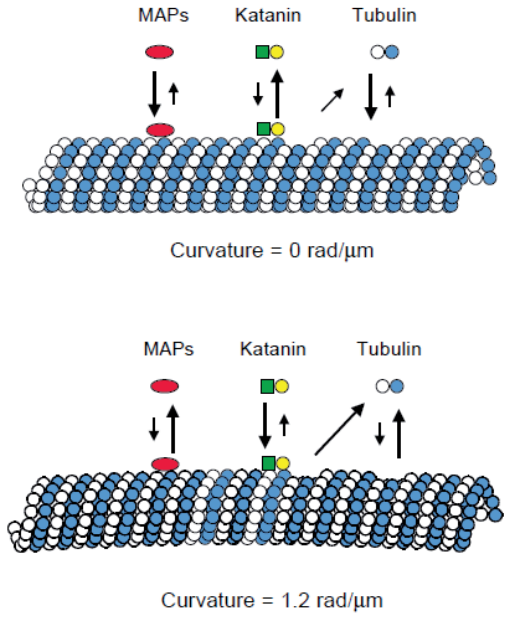


Figure 24 : Mécanismes potentiels de cassure des microtubules courbés
En haut, microtubule droit ; en bas, microtubule courbé. Les flèches épaisses représentent les interactions favorisées par la morphologie du microtubule. Voir le texte pour la description des 3 modèles proposés. D'après (Odde et al., 1999).

Ainsi, il se pourrait qu'une courbure du pont intercellulaire déstabilise les microtubules du pont et aide à l'abscission. Une étude récente montre l'organisation des microtubules dans le pont par microscopie électronique et reconstruction tomographique (Figure 25). En début

de cytocinèse, les microtubules sont parfaitement droits dans le pont alors qu'en cytocinèse tardive les microtubules sont fortement courbés sur le côté du midbody. Les auteurs proposent que cette courbure soit à l'origine de la cassure des microtubules pendant l'abscission (Schiel et al., 2011). Au cours de mes expériences, j'ai pu en effet observer certains ponts intercellulaires très courbés. En revanche, j'ai pu observer également que la morphologie du pont varie beaucoup en fonction du comportement des cellules filles : droit si les cellules sont éloignées et courbé si les cellules sont très proches. J'aurai l'occasion de revenir sur ce point à plusieurs reprises, à la fois dans la partie Résultats et dans la partie Discussion.

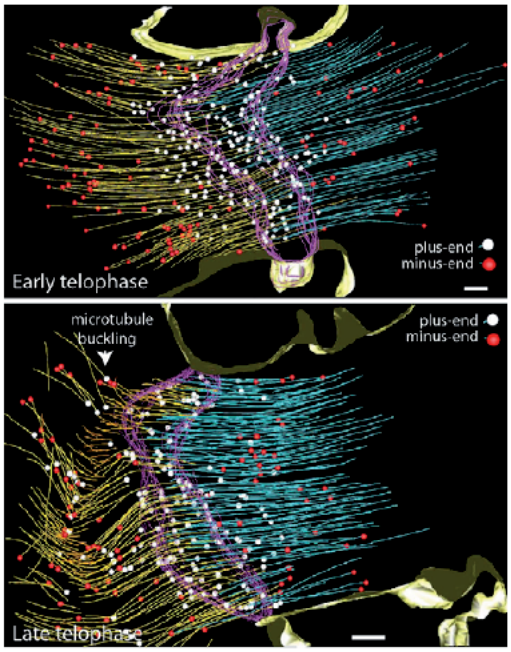


Figure 25 : Organisation des microtubules en cytocinèse précoce et tardive
Reconstruction tomographique des microtubules du pont intercellulaire à partir de clichés de microscopie électronique. En haut, cytocinèse précoce ; en bas, cytocinèse tardive. Les microtubules provenant de la cellule de gauche sont représentés en jaune, ceux de la cellule de droite en bleu. Les bouts « plus » et « moins » des microtubules sont représentés par une boule blanche et rouge respectivement. La membrane plasmique est représentée en jaune, et les contours du midbody en violet. Echelle : 200 nm. D'après (Schiel et al., 2011).

2. La fission de membrane

La fission de la membrane plasmique constitue la toute dernière étape de l'abscission, conduisant à l'individualisation des deux cellules filles. Au niveau de la cellule, plusieurs mécanismes de fission des membranes co-existent, assistés ou non de machineries particulières. La **séparation de phase** des lipides est l'un des mécanismes de fission qui ne requiert aucune protéine spécialisée. Dans un mélange de lipides, les lipides ayant des structures intrinsèques différentes ont tendance à se séparer, formant ainsi des regroupements de composition identique pour minimiser les interfaces. Ainsi, au sein d'une

bicouche lipidique, les lipides de même nature se regroupent et forment un disque. Si la répulsion est trop forte, cela peut former une vésicule qui bourgeonne à l'extérieur de la bicouche pour diminuer encore l'interface (diamètre du cou de la vésicule plus petit que le diamètre du disque). Si la répulsion est encore plus forte, cela peut exclure complètement la vésicule par fission de membrane (Baumgart et al., 2003; Bacia et al., 2005). La fission de membrane par séparation de phase a également été observée sur des tubes de membranes tirés à partir d'un liposome. Le diamètre très petit du tube trie les lipides par leur affinité pour les membranes courbées, le tube n'étant composé que de lipides affins pour les fortes courbures. Dans ce cas, les tubes sont coupés spontanément par fission de la membrane (Roux et al., 2005). Dans la cellule, plusieurs machineries spécialisées sont aujourd'hui bien décrites : la **Dynamine**, impliquée dans la production de vésicules synaptiques, l'endocytose de vésicules à manteau de clathrine, ou la fission des caveolae ; les **machineries similaires à la Dynamine**, par exemple impliquées dans la fission des mitochondries et des chloroplastes ; les protéines **COPI** et **COPII** impliquées dans le trafic du réticulum endoplasmique vers le Golgi ; les **ESCRT**, impliqués dans le bourgeonnement des virus, la formation des corps multivésiculaires ou MVB (multi-vesicular bodies) et l'abscission cytokinétique. Dans ce paragraphe, je détaillerai uniquement deux grands types de machinerie : la Dynamine et les ESCRT.

a. La Dynamine

La Dynamine est l'une des premières protéines de fission découvertes (pour une revue voir (Lenz, Morlot, et al., 2009)). Cette GTPase s'assemble en filament et s'associe autour du cou des vésicules pour permettre leur fission, par exemple lors de l'endocytose (Figure 26 à droite). De nombreuses études ont permis de mieux comprendre son fonctionnement, mais le mécanisme précis de fission n'est pas encore complètement élucidé. Néanmoins, plusieurs modèles s'accordent pour proposer un mécanisme à plusieurs niveaux. En s'enroulant autour du cou de la vésicule, la Dynamine induit, de façon dépendante de l'hydrolyse du GTP, une **constriction** du cou de la vésicule qui rapproche les deux membranes et facilite la fusion. *In vitro* la Dynamine forme des tubes autour desquels elle **s'assemble en hélice**. En hydrolysant le GTP, l'hélice de Dynamine tourne et forme des super-tours (Figure 26 à gauche). Cela produit alors une tension longitudinale au tube qui aide à la fission (Roux et al., 2006). Il est proposé que l'actine puisse faire de même *in vivo* en tirant sur les vésicules (Merrifield et al., 2005). En parallèle de cette action mécanique, la **torsion** pourrait également contribuer au rapprochement des deux membranes, ou permettre directement la fission si les deux membranes se trouvent apposées lors de la torsion. Enfin, l'étape de désassemblage de la Dynamine semblerait également nécessaire à la fission de la membrane.

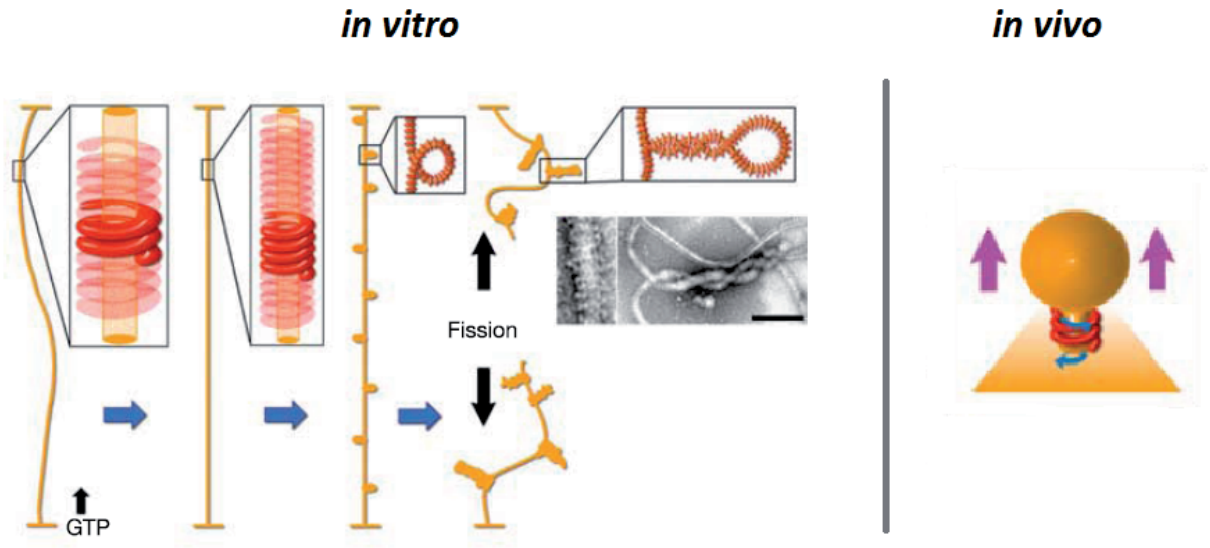


Figure 26 : Modèle de la torsion de la Dynamine
A gauche : *in vitro,* la Dynamine s'assemble en hélice autour du tube de membrane, et sous l'action de l'hydrolyse du GTP forme des tours et des super-tours, augmentant ainsi la tension longitudinale du tube et favorisant la fission. Une image en microscopie électronique montre un super-tour de Dynamine. A droite : schéma illustrant la fission *in vivo* d'une vésicule. La Dynamine s'enroule autour du cou de la vésicule, la torsion de la Dynamine créer une tension longitudinale qui tire sur la vésicule (flèches violettes) et facilite la fission. D'après (Roux et al., 2006).

Il est intéressant de noter que, dans la fission de membrane, le rôle de la **tension** dépend de la géométrie du système (Lenz, Morlot, et al., 2009). Si la tension est longitudinale à l'objet à couper, elle facilite la fission. Par exemple, si la tension est parallèle au tube de membrane, la tension aide la fission pour deux raisons : i) le tube étiré voit son diamètre diminuer et donc les membranes se rapprocher ; ii) la tension aide à maintenir les structures en place lors de la fission, un peu comme le fait de mettre un élastique sous tension facilite sa coupure par des ciseaux. Si l'objet est une vésicule et non un tube, la tension longitudinale (par exemple de l'actine qui tire sur une vésicule) facilite également la fission, pour les même raisons que le tube. En revanche, si la tension est perpendiculaire à l'objet à couper, la tension défavorise la fission de membrane puisqu'elle force les membranes à revenir à un état plat (Figure 27).

Dans cet esprit, on peut maintenant se poser la question du rôle de la **tension de membrane** dans la fission. Dans le contexte d'un tube, la tension de membrane est colinéaire à la tension longitudinale, donc facilite la fission du tube. A l'opposé, dans le contexte d'une vésicule, la tension de membrane est perpendiculaire à la tension longitudinale, et empêche la fission (Figure 27). En effet, une augmentation de la tension de membrane bloque l'endocytose (Dai et al., 1997), alors qu'une baisse de la tension de membrane augmente le taux d'endocytose (Raucher & Sheetz, 1999). Même si le rôle de la tension de membrane n'a été démontré que dans l'endocytose, il est très probable qu'il soit le même pour tout type de fission membranaire de géométrie similaire puisqu'il est fondé sur un principe mécanique.

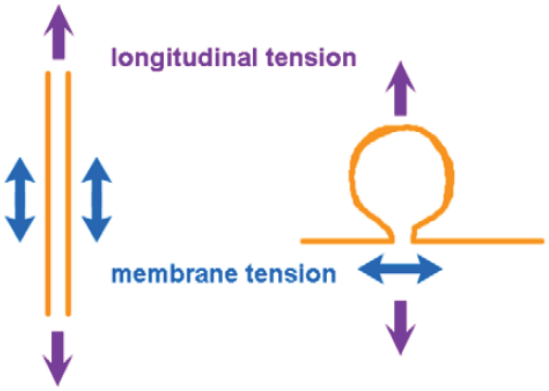


Figure 27 : Rôle de la tension sur la fission membranaire
Les flèches violettes représentent la tension longitudinale, les flèches bleues la tension de membrane. Dans les deux cas, la tension longitudinale facilite la fission. Dans le cas du tube, la tension de membrane, parallèle à la tension longitudinale, facilite la fission. En revanche, dans le cas de la vésicule, la tension de membrane est perpendiculaire à la tension longitudinale et va à l'encontre de la fission. D'après (Lenz, Morlot, et al., 2009).

b. Les ESCRT-III

Les ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) sont classés en 5 groupes (0, I, II, III et désassemblage par Vps4), chaque groupe étant composé de plusieurs sous-unités. Si leur fonction originelle est probablement liée à la cytocinèse, ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires (Figure 28) : la régulation du trafic vésiculaire (d'où leur nom), l'autophagie, l'expression génique. Le sous-groupe des **ESCRT-III** est en particulier impliqué dans la **fission membranaire** : lors du bourgeonnement des virus (comme le VIH), lors de la formation des corps multivésiculaires (ou MVBs pour Multi-Vesicular Bodies, où des vésicules bourgeonnent vers l'intérieur d'une sorte de vacuole intracellulaire), et lors de l'abscission en fin de cytocinèse.

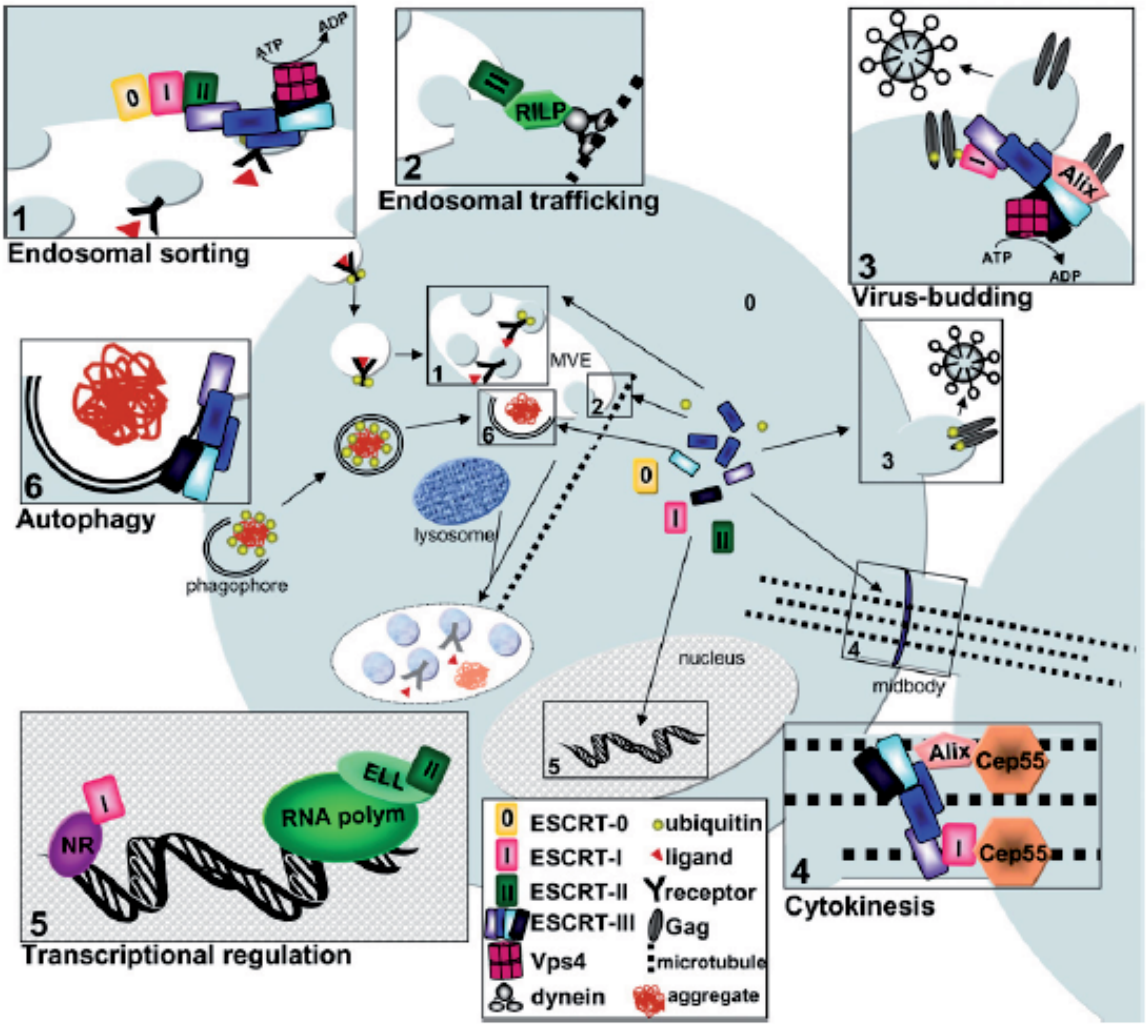


Figure 28 : Diversité des processus cellulaires impliquant les ESCRT
Tiré de (Roxrud et al., 2010).

La machinerie des ESCRT est très conservée phylogénétiquement. Les ESCRT ont beaucoup été étudiés chez la levure et chez les cellules animales, certaines sous-unités de la levure étant parfois retrouvées sous plusieurs isoformes chez les cellules animales. En revanche, les sous-unités homologues portent souvent un nom différent chez la levure et chez les cellules animales, résumés dans la Table 1 ci-après. Les ESCRT sont également présents chez les plantes (Spitzer et al., 2006) : la protéine ELC, homologue de Tsg101, est impliquée dans la cytocinèse, mais par une voie différente de celle de la levure ou des cellules animales (*via* la régulation des microtubules). Des homologues des ESCRT-III et de Vps4 ont même été retrouvés chez l'archée Sulfolobus (R. Y. Samson et al., 2011). S'il existe un grand nombre de sous-unités appartenant à la famille des ESCRT, il existe également une grande diversité des protéines qui interagissent directement avec les différentes sous-unités des complexes ESCRT-0, I, II et III. La revue (Roxrud et al., 2010) présente un tableau exhaustif de ces interactions. Il serait fastidieux et hors contexte d'exposer en détail toutes les fonctions des

ESCRT, c'est pourquoi ce paragraphe est ciblé sur le fonctionnement des ESCRT-III lors de la fission membranaire, fonction essentielle lors de l'abscission.

		Sous-unités ESCRT-III				Désassemblage
Nom	Humain	CHMP6	CHMP4 A,B,C	CHMP3	CHMP2 A,B	Vps4
	Levure	Vps20	Snf7 ou Vps32	Vps24	Vps2	Vps4
Fonction proposée		Nucléateur de l'oligomérisation de CHMP4	Homo-oligomérisation, séquestration de cargo, déformation de membrane	Terminaison de l'oligomère de CHMP4 (coiffe), recrute CHMP2	Recrute Vps4 pour le désassemblage des ESCRT-III	Interagit avec les ESCRT-III (CHMP2) *via* son domaine MIT, désassemble les ESCRT-III grâce à sont activité AAA-ATPase

Table 1 : Machinerie des ESCRT-III

Au contraire de la Dynamine qui s'enroule autour du cou des vésicules, les ESCRT-III s'assemblent en filaments hélicoïdaux à l'intérieur de l'objet à couper. *In vivo*, les ESCRT-III sont présents au cou du bourgeon du virus VIH (Figure 29A), à l'intérieur du pont intercellulaire en cytocinèse (Figure 29B), et à l'intérieur du cou des vésicules bourgeonnant vers le corps multivésiculaire (Figure 31). Cette machinerie est capable d'assurer des événements de fission divers (en termes de localisation cellulaire et de fonction), mais il s'agit toujours d'événements topologiquement similaires. Des cellules COS7 transfectées par Snf7 (homologue de CHMP4) présentent sur leur membrane interne des filaments enroulés en hélice (Figure 29C). La coexpression dans ces mêmes cellules de Snf7 et d'un mutant dominant négatif de Vps4 entraîne la formation de bourgeons et de tubules à la surface externe de la membrane (Hanson et al., 2008). Le mécanisme proposé est la formation intracellulaire de structures d'ESCRT-III qui, ne pouvant pas se désassocier sans Vps4, s'accumulent à l'intérieur d'un bourgeon et s'étendent en formant des tubules (Figure 29 D et E).

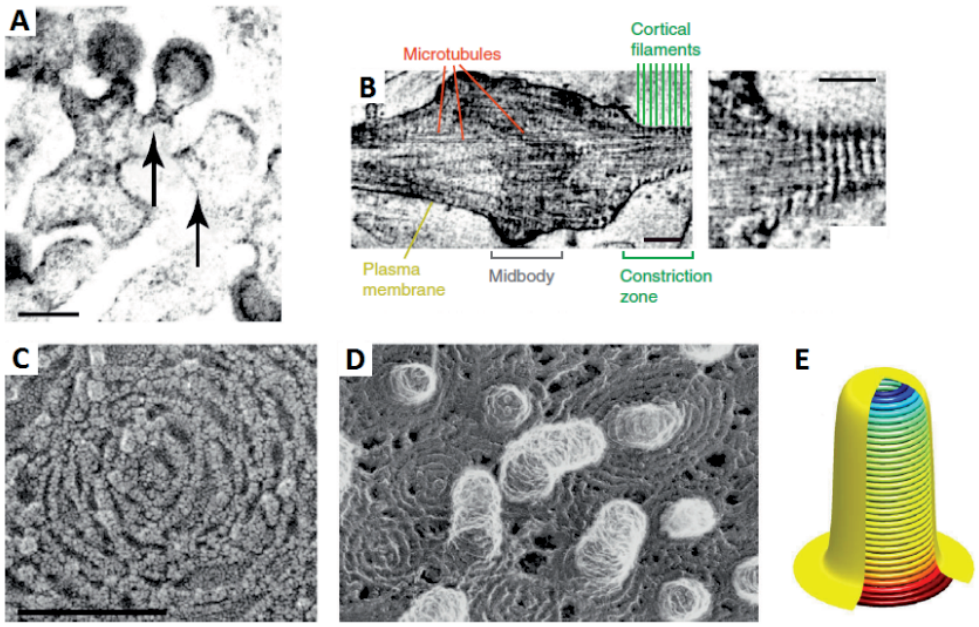


Figure 29 : Les ESCRT-III *in vivo*

A) Microscopie électronique à transmission de coupes de cellules 293T transfectées par une construction exprimant le provirus VIH-I. Le bourgeonnement des virus est inhibé par l'expression d'un mutant dominant négatif de Vps4 : DsRed-VPS4B-E235Q. Echelle 100 nm. D'après (Schwedler et al., 2003). B) Microscopie électronique de cellules fixées par congélation à haute pression. Pont intercellulaire à hémi-abscission. Echelles 200 nm. D'après (Guizetti et al., 2011). C) Microscopie à balayage de la surface interne de la membrane de cellules COS7 exprimant FLAG-hSnf7-1 (CHMP4). D) Microscopie à balayage de cellules COS7 co-exprimant hSnf7-1 (CHMP4) et un mutant dominant négatif de Vps 4 : VPS4B(E235Q)-GFP. Pour C) et D) Echelle 100 nm ; d'après (Hanson et al., 2008). E) Modèle de formation de tubules à la surface de la cellule par l'assemblage de structures internes. D'après (Lenz, Crow, et al., 2009).

Des études *in vitro* ont permis de mieux comprendre le mécanisme de fission de membrane par les ESCRT-III (Figure 30). La protéine de levure Vps24 (homologue de CHMP3) est capable de s'auto-assembler *in vitro* pour former des filaments hélicoïdaux (Ghazi-tabatabai et al., 2008), témoignant de la capacité des ESCRT-III à s'organiser en structures complexes (Figure 30A). Wollert et collaborateurs ont entièrement reconstitué *in vitro* une machinerie ESCRT-III capable de réaliser la fission de membrane (Wollert et al., 2009). Ils utilisent un système de liposomes (GUV : Giant Unilamellar Vesicules) en suspension dans une solution contenant un mélange de protéines de levure du groupe ESCRT-III : Vps20 (CHMP6), Snf7 (CHMP4), Vps24 (CHMP3), Vps2 (CHMP2), et Vps4 pour son activité de désassemblage. De cette façon, les ESCRT-III s'assemblent à la surface des liposomes et forment des vésicules à l'intérieur des liposomes, mimant parfaitement la formation de corps multivésiculaires dans la cellule (Figure 30B). Ils montrent que Vps20 (CHMP6), Snf7 (CHMP4) et Vps24 (CHMP3) suffisent à assurer la fission de membrane. Vps2 (CHMP2) participe uniquement au recrutement de Vps4, et tous deux assurent le désassemblage et le recyclage des ESCRT-III. Les auteurs proposent le modèle suivant (Figure 30C) : Vps20 (CHMP6) s'associe en premier à la membrane, puis recrute Snf7 (CHMP4) qui s'assemble en structure hélicoïdale, Vps24 (CHMP3) termine cette hélice, ce qui conduit à la fission de la membrane. Vps2 (CHMP2) s'associe finalement avec les autres sous-unités, recrutant ainsi Vps4 qui permet le

désassemblage de la structure et la ré-utilisation des ESCRT-III pour d'autres événements de fission. On peut noter ici que Vps4 n'est pas à proprement parler une sous-unité ESCRT, mais est essentielle à la dissociation des ESCRT-III, et donc à leur dynamique. Vps4 est une AAA ATPase (tout comme la Spastine) qui s'assemble en dodécamère (2x6) (Babst et al., 1998) et permet, en hydrolysant l'ATP, de désassembler la structure filamenteuse des ESCRT-III. Une autre étude *in vitro* (Fyfe et al., 2011) a montré que l'association ESCRT-II/Vps20(CHMP6) forme un complexe s'associant préférentiellement sur les membranes courbées (préférence pour les vésicules de 95 nm comparé à des vésicules de 183 nm). Ce complexe ESCRT-II/Vps20 recrute ensuite la machinerie des ESCRT-III, notamment Vps32 (CHMP4). Ainsi, l'association de ESCRT-II et Vps20 constitue un système de reconnaissance de courbure permettant d'assembler les filaments d'ESCRT-III spécifiquement sur les membranes fortement courbées (Figure 30D). Il serait intéressant d'étudier si un tel système est présent au niveau du pont intercellulaire et s'il pourrait être impliqué dans l'abscission.

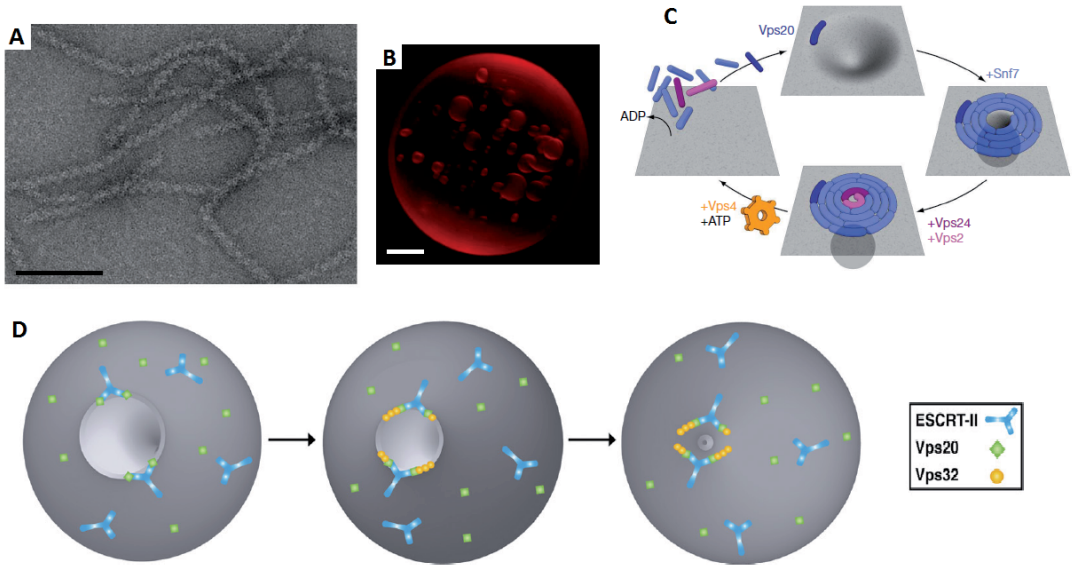


Figure 30 : Les ESCRT-III *in vitro*

A) Microscopie électronique en coloration négative de filaments hélicoïdaux de la protéine de Vps24 (CHMP3). Echelle 100 nm. D'après (Ghazi-tabatabai et al., 2008). B) Reconstruction tri-dimentionnelle d'une GUV traitée par Vps20 (CHMP6), Snf7 (CHMP4), Vps24 (CHMP3), Vps2 (CHMP2), et Vps4. Echelle 5 µm. C) Modèle proposé pour la fission de membrane par les ESCRT-III. B) et C) D'après (Wollert et al., 2009). D) Modèle de reconnaissance de la courbure de membrane par ESCRT-II/Vps20(CHMP6) qui recrutent ensuite Vps32 (CHMP4). D'après (Fyfe et al., 2011).

c. Une remarque « topologique »

Il est intéressant de comparer topologiquement ces deux machineries de fission de membrane, l'une étant l'opposé de l'autre. Ces machineries, cellulaires donc à l'intérieur du cytoplasme, sont localisées à des endroits différents par rapport au cou à fissionner (vésicule ou virus). La Dynamine s'associe autour du cou de la vésicule, alors que les ESCRT-III s'assemblent à l'intérieur du cou du bourgeon contenant le virus (Figure 31). Lors de

l'abscission, la machinerie de fission de la membrane doit forcément s'assembler à l'intérieur du tube à couper puisque les composants ne peuvent pas sortir du pont (donc sortir de la cellule) pour le couper depuis l'extérieur. Ainsi, pour une raison évidente de topologie, les ESCRT-III sont plus à même de prendre en charge la fission de membrane lors de l'abscission que la Dynamine.

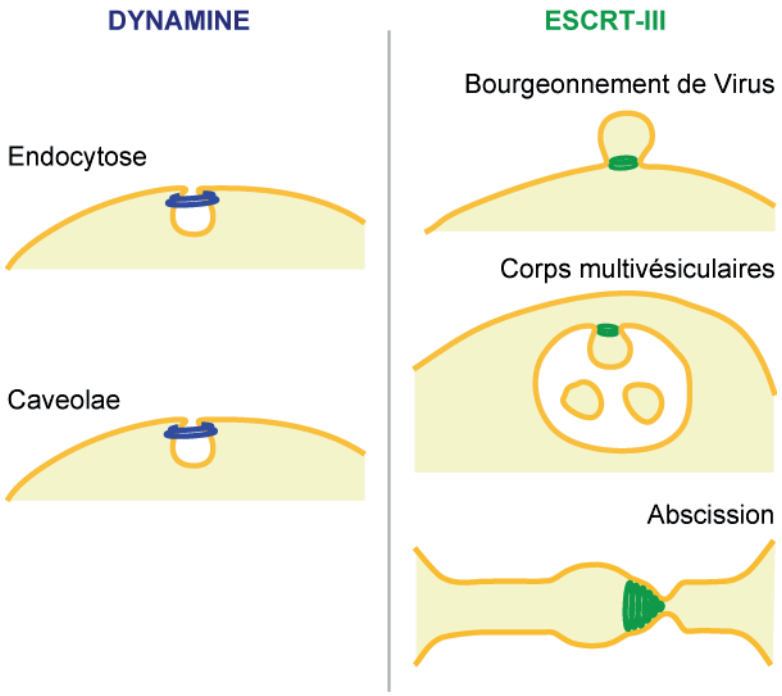


Figure 31 : Topologie inversée des événements de fission impliquant la Dynamine ou les ESCRT-III
La Dynamine (en bleu) s'assemble autour du cou à fissionner, alors que les ESCRT-III (en vert) s'assemblent à l'intérieur.

3. Les différents modèles d'abscission

a. Rupture par traction

Le modèle d'abscission par rupture du pont est le plus ancien. En 1977, Mullins et Biesele montrent que le pont s'affine au cours du temps, et supposent qu'il est finalement tiré et cassé par le mouvement des cellules filles (J. M. Mullins & Biesele, 1977). En 1997, Burton et Taylor étudient les forces exercées par les cellules filles lors de la cytocinèse au moyen d'un substrat de silicone très déformable qui forme des plis sous l'effet des forces (un peu comme un tapis souple). Ils montrent alors que les cellules exercent des forces de traction lors du début de la cytocinèse et que ces forces persistent lors du réétalement. Ils proposent qu'elles soient impliquées dans la rupture du pont, les cellules filles tirant chacune de leur côté pour casser le pont (Burton & Taylor, 1997). Plus récemment, une étude dans les chondrocytes de souris montre que la protéine Profiline (effecteur des formines) n'est pas nécessaire à l'ingression du sillon mais à l'abscission. Les auteurs proposent que la Profiline

soit nécessaire à la motilité des cellules filles afin qu'elles développent une force suffisante pour casser le pont intercellulaire (Böttcher et al., 2009).

Ce modèle d'abscission par rupture est largement alimenté par les études réalisées chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, où plusieurs modes de cytocinèse ont été décrits. Dans leur revue de 2004, Uyeda et Nagasaki redéfinissent les différents types de cytocinèse (Uyeda & Nagasaki, 2004) en leur donnant les noms de A, B, C, et D (Figure 32) :

- Cytocinèse A : chez les cellules sauvages, en suspension ou adhérentes, il y a constriction d'un anneau acto-myosique. Il s'agit ici d'une cytocinèse assez « classique », couplée au cycle cellulaire et indépendante de l'adhésion.

- Cytocinèse B : chez les cellules mutées pour la myosine-II (pas d'anneau contractile) adhérentes au substrat, il y a une cytocinèse couplée au cycle cellulaire qui utilise des forces de traction. Il est proposé que les fronts de migration des cellules filles, composés uniquement d'actine, tirent chacun de leur côté ; des forces de tractions opposées sont alors générées par les deux fronts de migration. Ces forces permettent une ingression passive de la zone équatoriale et la coupure du pont par rupture. Dans ce cas de figure, le substrat est donc indispensable pour que les cellules développent suffisamment de force pour se couper. Il est probable que les cellules sauvages cultivées sur un substrat utilisent à la fois la cytocinèse A et B.

- Cytocinèse C : chez les cellules mutées pour la myosine-II cultivées en suspension, il y a une succession de mitoses sans cytocinèse conduisant à une cellule géante multi-nucléée. Lorsque cette cellule géante est re-déposée sur un substrat, elle forme rapidement plusieurs fronts de migration qui tirent le cytoplasme de la cellule et conduisent à une cytofission. Cette fois, cette cytocinèse est découplée du cycle cellulaire, dépendante de l'adhésion et réalisée grâce aux forces de traction.

- Cytocinèse D, ou « midwifering » en anglais : cette fois, la cytocinèse fait intervenir une troisième cellule qui assiste la séparation des deux cellules filles. Cette cellule est appelée « cellule sage-femme » ou « midwife ». Ce mode de cytocinèse a d'abord été décrit chez l'amide *Entamoeba invadens* (Biron et al., 2001). La cellule sage-femme se dirige par chémotaxie vers le site de clivage, puis se faufile entre les deux cellules filles, assurant la rupture mécanique du pont. Ce mode de cytocinèse a également été décrit chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*.

Ainsi, les forces de traction ont un rôle prédominant dans la cytocinèse de *Dictyostelium discoideum*, à la fois à un stade précoce (ingression du sillon) et à un stade tardif (coupure du pont). Cependant, il est possible que les mécanismes de cytocinèse et d'abscission ne soient pas conservés entre ce protiste et les eucaryotes supérieurs. Par exemple, la structure même du pont intercellulaire est différente, le pont étant plutôt une continuité cytoplasmique sans organisation particulière (pas de midbody).

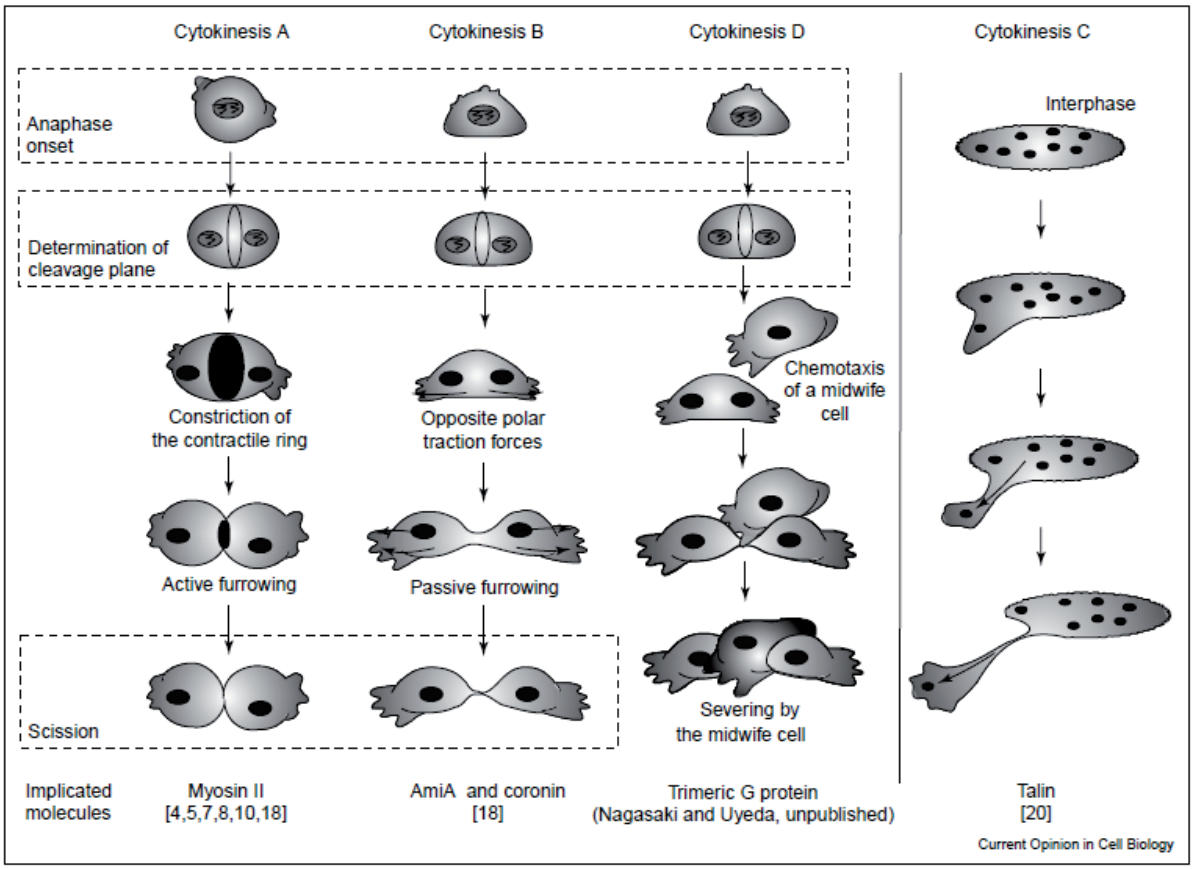


Figure 32 : Quatre modes de cytocinèse chez *Dictyostelium discoideum*
Voir le texte pour la description des différents modes. D'après (Uyeda & Nagasaki, 2004).

Finalement, même si ce modèle de rupture du pont peut paraître plausible, plusieurs questions sont encore sans réponses :

- Comment l'intégrité des cellules filles est-elle maintenue lors de la cassure ? ou comment éviter les « fuites » ?
- Comment la membrane plasmique, déchirée par la rupture, est-elle réparée ? Y a-t-il une fission contrôlée des membranes lors de la rupture ?
- Il a été montré qu'il existe certaines caractéristiques communes entre la cicatrisation d'un tissu endommagé (« wound healing ») et la cytocinèse : formation d'un anneau contractile acto-myosique dont la mise en place est dépendante des microtubules et des Rho-GTPases (Darenfed & Mandato, 2005). Ces mécanismes pourraient-il expliquer également l'abscission par rupture ?
- Qu'en est-il des cellules qui n'exercent pas de forces de traction, par exemple dans les tissus ou lorsque les cellules sont très peu motiles ?

- Enfin, l'observation en dynamique de l'abscission chez des cellules peu motiles montre que la coupure du pont se fait d'une manière très nette et systématique (Steigemann et al., 2009; Guizetti et al., 2011; Elia et al., 2011), observation peu compatible avec un modèle de rupture et plutôt en faveur d'un autre mécanisme d'abscission.

b. Fusion massive de vésicules

Ce deuxième modèle propose qu'une fusion massive de vésicules (provenant de la sécrétion du Golgi et des endosomes de recyclage) au niveau du midbody soit à l'origine de l'abscission. En effet, le trafic vésiculaire, régulé par le complexe Exocyst, les protéines SNARE ou Rab11/FIP3, est essentiel à l'abscission (décrit dans le chapitre précédent). Il a également été montré que des vésicules s'accumulent au midbody et disparaissent peu de temps avant l'abscission (Gromley et al., 2005). Ces vésicules pourraient fusionner de façon synchrone, entre-elles et avec la membrane plasmique, provoquant ainsi la rupture du pont intercellulaire (Figure 33). Il est intéressant de comparer ce modèle au mécanisme de fin de cytocinèse chez les plantes, où le phragmoplaste, sorte de grande vacuole issue de la fusion de nombreuses vésicules du trafic, se forme entre les cellules filles et fusionne ensuite avec la membrane plasmique pour séparer les deux cellules filles.

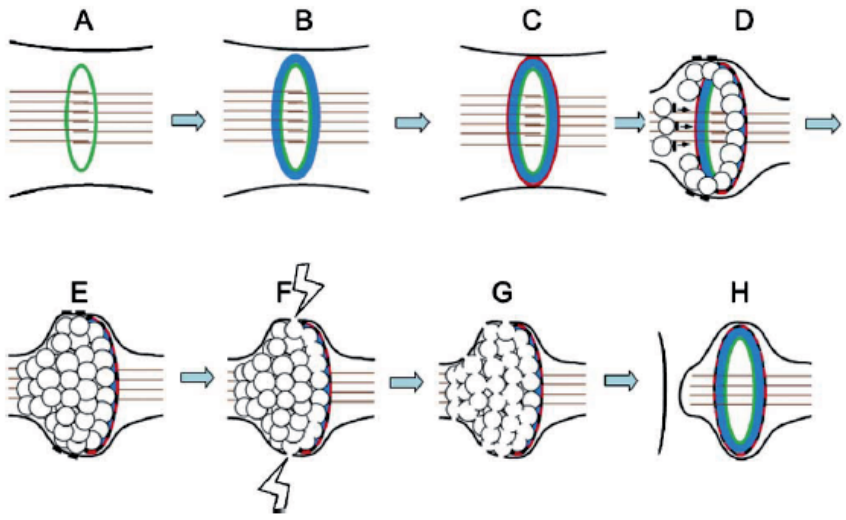


Figure 33 : Modèle d'abscission par fusion de vésicules
De A à H : évolution dans le temps. Les vésicules provenant du Golgi s'accumulent au niveau du midbody puis fusionnent de façon synchrone (F et G), conduisant à la fission de la membrane plasmique du pont intercellulaire (H). D'après (Gromley et al., 2005).

Cependant, plusieurs points restent à éclaircir pour compléter ce modèle :

- Cette fusion massive de vésicules est-elle effectivement responsable de l'abscission, ou joue-t-elle plutôt un rôle de préparation à l'abscission, par exemple en diminuant de façon drastique le diamètre du pont à couper ?

- Comment les microtubules sont-ils éliminés du pont avant la fusion massive des vésicules ? Et comment les vésicules arrivent-elles au midbody une fois les microtubules coupés ?

- Quel est le signal qui déclenche la fusion synchrone des vésicules ?

c. Fission par les ESCRT-III

Le troisième modèle proposé pour le mécanisme d'abscission implique les ESCRT. Carlton et collaborateurs montrent en 2007 que le bourgeonnement du virus du VIH et l'abscission utilisent les mêmes sous-unités ESCRT : Tsg101 et Alix (Jez G Carlton & Juan Martin-Serrano, 2007). En 2011, deux études ont permis une grande avancée dans la compréhension du mécanisme de l'abscission par les ESCRT grâce à l'utilisation de microscopie à haute résolution ; elles sont toutes deux décrites ci-dessous.

Guizetti et collaborateurs, grâce à une approche en microscopie corrélative (vidéomicroscopie puis microscopie électronique à transmission et analyse par reconstruction tomographique), ont mis en évidence la formation d'une **zone de constriction** du pont à l'endroit où l'abscission a lieu, une zone de constriction de chaque côté du midbody lorsque l'abscission a lieu de part et d'autre du midbody (Guizetti et al., 2011). Au niveau de cette zone de constriction, une **structure en hélice** (filament de 17 nm de large) entoure les microtubules du pont, formant de petites rides sur la membrane plasmique tout comme Mullins l'observait en 1977 (Figure 34). En microscopie optique, les ESCRT-III forment une structure conique sur le côté du midbody au même endroit que ces zones de constriction, suggérant que ces structures hélicoïdales soient composées de filaments d'ESCRT-III. De plus, la déplétion par siRNA de CHMP2A, un composant ESCRT-III, abolit la formation de ces hélices ainsi que la formation de la zone de constriction, démontrant que ces structures sont ESCRT-III dépendantes. La déplétion de CHMP2A inhibe également l'abscission, ce qui suggère que la formation des zones de constriction soit indispensable à l'abscission. Les auteurs montrent également, grâce à l'utilisation de la technique d'imagerie 3D en illumination structurée pour augmenter la résolution optique, que les complexes ESCRT sont localisés sous forme de deux anneaux sur les bords du midbody. Juste avant l'abscission, seuls les ESCRT-III (CHMP2A, CHMP2B, CHMP4B, CHMP6) participent à la formation de la structure conique sur le bord du midbody, les autres ESCRT (Alix et Cep55) restant au midbody. La Spastine est quant à elle localisée à l'extrémité de ce cône. La déplétion de la Spastine par siRNA n'empêche pas la formation de la zone de

constriction ni la formation des hélices mais retarde uniquement l'abscission. Le traitement par une drogue qui dépolymérise les microtubules compense ce retard d'abscission, ce qui suggère que la Spastine n'est pas impliquée dans la formation des zones de constriction essentielles à l'abscission mais a uniquement un rôle de coupure des microtubules du pont. Les auteurs proposent alors le modèle suivant, représenté en Figure 35 : Cep55 et Alix, localisées au centre du midbody, recrutent les ESCRT-III au niveau du midbody ; au moment de l'abscission, les ESCRT-III s'assemblent en filaments hélicoïdaux et forment une structure conique sur le côté du midbody, provoquant une forte constriction du pont ; la Spastine, interagissant avec les ESCRT-III *via* CHMP1B, est emmenée au site d'abscission, à l'extrémité de ce cône. Finalement, les ESCRT-III opèrent la fission de la membrane plasmique dès que tous les microtubules du pont sont coupés. Ce modèle a la force de proposer un **couplage du système de coupure des microtubules et du système de fission membranaire**, les ESCRT-III rapprochant de plus en plus les membranes au fur et à mesure que la Spastine coupe les microtubules du pont, pour finalement prendre en charge la fission finale lorsque tous les microtubules ont disparu du pont.

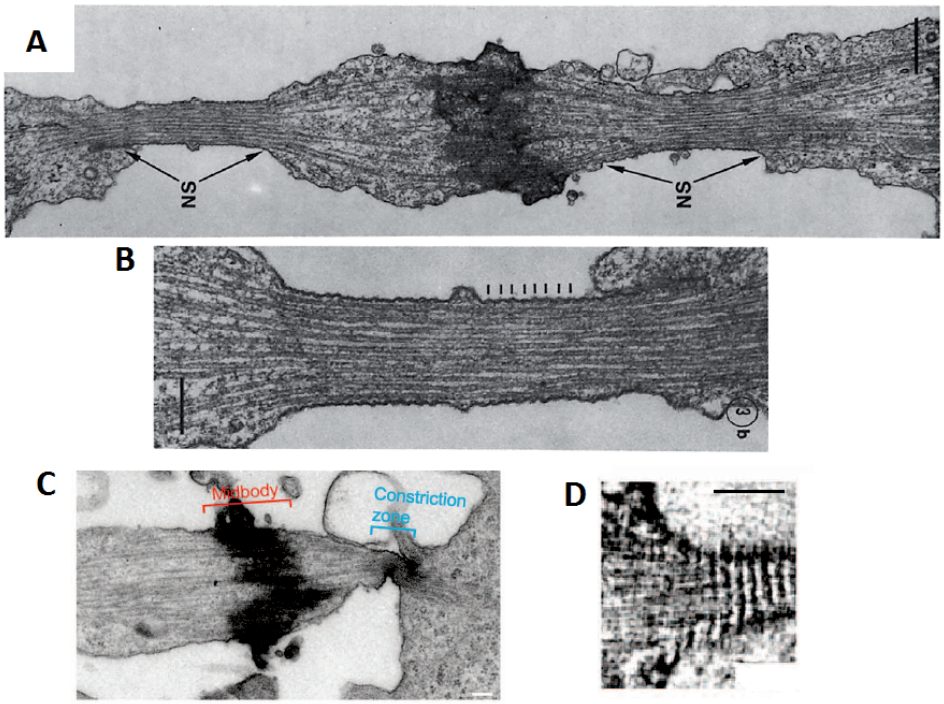


Figure 34 : Zone de constriction du pont au site d'abscission

Images en microscopie électronique à transmission du pont intercellulaire peu de temps avant abscission. A) une zone de constriction de chaque côté du midbody. B) zoom sur la zone de constriction montrant les rides de la membrane plasmique à intervalles réguliers. C) zone de constriction juste avant abscission. D) Technique de préparation des échantillons par congélation sous haute pression permettant d'observer les structures en hélices émanant du midbody. A) et B) d'après (J. M. Mullins & Biesele, 1977) ; C) et D) d'après (Guizetti et al., 2011). Echelles : A) 500 nm ; B) à D) 200 nm.

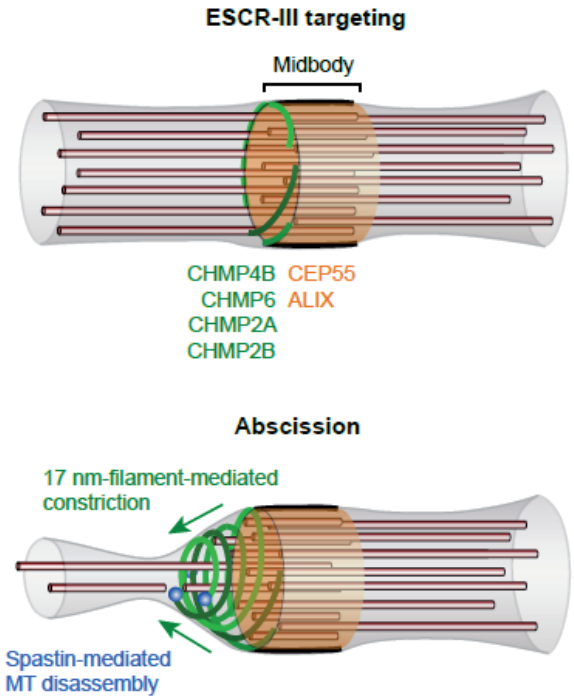


Figure 35 : Modèle d'abscission par les ESCRT-III – Guizetti et coll., 2011

Elia et collaborateurs montrent également en microscopie électronique des zones de constriction de part et d'autre du midbody (Elia et al., 2011). De plus, ils décrivent de façon détaillée le recrutement dans le temps et dans l'espace des différents composants du système ESCRT grâce à l'utilisation de vidéomicroscopie à haute résolution et de reconstruction d'images 3D acquises en illumination structurée. Ils montrent que Cep55 est recruté en premier, et ce au centre du midbody. Ensuite, Tsg101 et Alix sont recrutés sous forme de deux anneaux sur le côté du midbody. Finalement, CHMP4B et Vps4 sont recrutés sur les bords du midbody, formant deux anneaux extérieurs. Au moment de l'abscission seuls CHMP4B et Vps4 forment une structure secondaire au niveau de la zone de constriction, détachée du midbody. Les auteurs proposent que CHMP4B initie la nucléation de la structure secondaire à partir du midbody, puis que cette structure se détache, formant un site propre au niveau de la zone de constriction. Vps4 se situe également au niveau de cette zone de constriction et participe probablement à la finalisation de la fission membranaire (Figure 36).

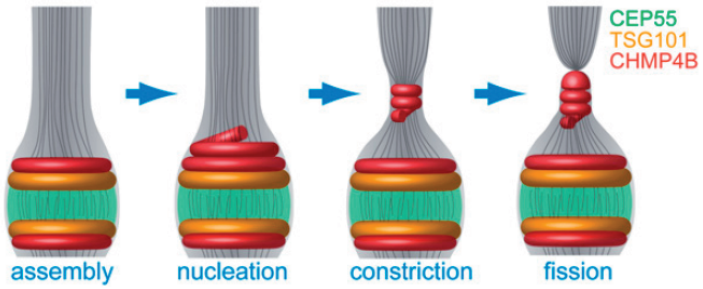


Figure 36 : Modèle d'abscission par les ESCRT-III – Elia et al., 2011

Ce modèle d'abscission, pour le moment le plus complet et le plus réaliste, peut cependant être critiqué sur quelques points (Neto & Gould, 2011) :

- Certains chercheurs émettent l'hypothèse que les structures hélicoïdales observées en microscopie électronique par Guizetti et coll. pourraient être des assemblages de septines. En effet, l'activité d'assemblage de la septine SEPT9 est indispensable à l'abscission, et il se pourrait que les septines forment un filament en hélice similaire à celui décrit précédemment. Même si ces structures sont absentes lors de la déplétion de CHMP2A, l'immunomarquage en microscopie électronique pourrait apporter une preuve supplémentaire que ces hélices sont bien formées d'ESCRT-III.

- Une autre critique vient de la taille de la structure à couper. En effet, le diamètre du pont intercellulaire, de l'ordre du micromètre, est bien plus important que les structures habituellement coupées par les ESCRT (100 nm maximum pour le cou des virus). Même si la zone de constriction a un diamètre moindre par rapport au pont, Guizetti et coll. proposent justement que les ESCRT-III soient responsables de cette constriction, donc qu'ils s'assemblent sur une structure de 1µm de diamètre. Peut-être existe-il une étape préliminaire à la formation de l'hélice d'ESCRT-III qui consisterait à rétrécir le diamètre du pont pour atteindre un diamètre que les ESCRT-III pourraient couper.

d. Modèle mixte Vésicules/ESCRT-III

Après avoir exposé ces différents modèles d'abscission, il est intéressant de proposer un modèle mixte qui combinerait ces modèles et essaierait de répondre aux différentes critiques. Schiel et collaborateurs proposent que la fusion des vésicules régulées par Rab11/FIP3 provoque une ingression secondaire au niveau du pont, aboutissant au rétrécissement drastique du diamètre du pont mais sans le couper (Schiel et al., 2011). Cette ingression secondaire pourrait constituer une étape préparatrice du pont pour la fission par les ESCRT-III comme discuté ci-dessus. Cette notion de préparation du pont en vue de l'abscission est également discutée dans plusieurs revues (Neto & Gould, 2011; Schiel & Prekeris, 2011). Le complexe Exocyst, de part son rôle de régulateur du trafic vésiculaire et

de la fusion des vésicules *via* les protéines SNARE, pourrait également participer à la préparation du pont pour l'abscission en permettant i) la formation de domaines spécialisés au niveau de la membrane du pont ; et ii) la réduction du diamètre du pont par fusion de vésicules.

Ainsi, on pourrait avoir un modèle mixte où le trafic vésiculaire, provenant du Golgi (*via* Exocyst) ou des endosomes de recyclage (*via* Rab11/FIP3), assure la **maturation du pont** à la fois en terme de routage de certains régulateurs au midbody et en terme de diminution du diamètre du pont. Ensuite seulement, les **ESCRT-III**, recrutés au midbody *via* Cep55/Tsg101/Alix au cours de la phase de maturation, **finalisent l'abscission** en associant la fission de la membrane et la coupure des microtubules par la Spastine (Figure 37).

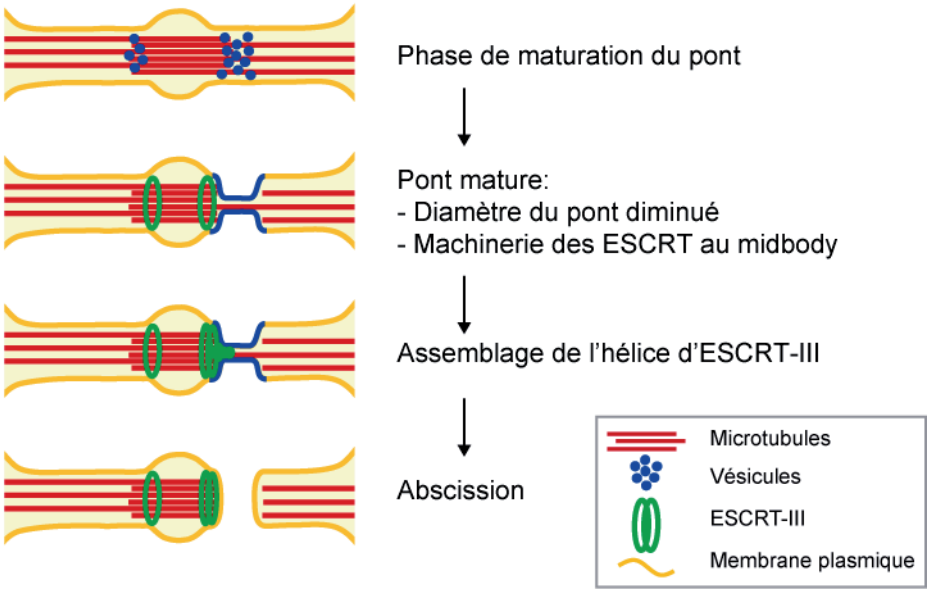


Figure 37 : Modèle mixte d'abscission (fusion de vésicules et fission par les ESCRT-III)

Il est intéressant de remarquer que la **notion de maturation** est associée à une **notion de temps**. En effet, le processus de maturation implique l'acquisition au cours du temps d'un certain nombre de caractéristiques pour arriver à un état mature. Ainsi, comprendre le mécanisme de maturation du pont implique la compréhension dans le temps des différentes étapes aboutissant à l'abscission ainsi que la compréhension des mécanismes qui régulent le passage d'une étape à la suivante.

4. La régulation dans le temps de l'abscission

Lorsque l'on observe le déroulement dans le temps des différentes étapes de la cytocinèse, il est étonnant de remarquer que la contraction de l'anneau en début de cytocinèse est assez rapide (quelques minutes) et très reproductible, alors que le temps nécessaire aux cellules

filles pour couper le pont intercellulaire est beaucoup plus long (jusqu'à plusieurs heures) et surtout très variable d'une lignée cellulaire à une autre, parfois même au sein d'un même lignée cellulaire. En 1985, Sanger et collaborateurs montrent que les premières cellules de l'embryon d'oursin se coupent en 15 min, alors que des cellules épithéliales en culture *in vitro* (Ptk2), mettent plus de 4h à se séparer définitivement (J. M. Sanger et al., 1985). Une étude sur cellules HeLa reporte des temps d'abscission allants de 3 à 6 heures (Dambournet et al., 2011), alors que d'autres études sur des cellules Hela Kyoto ou des cellules MDCK reportent des temps d'abscission autour de l'heure (Steigemann et al., 2009; Elia et al., 2011). Plusieurs questions se posent alors :

- Pourquoi l'ingression du sillon est-elle si rapide et la durée de persistance du pont si longue ? La coupure elle-même du pont nécessite-t-elle autant de temps, ou l'abscission est-elle déclenchée tardivement ? Dans le second cas de figure, quels sont les facteurs qui déclenchent l'abscission ?

- Pourquoi l'ingression du sillon est-elle si reproductible et le temps d'abscission si variable ? Quelles sont les conditions qui accélèrent l'abscission et celles qui la ralentissent, comment et dans quel but ?

- Pourquoi le pont ne se coupe-t-il pas immédiatement après sa formation ? Y a-t-il une phase de maturité incompressible nécessaire à sa coupure ?

De plus, comme toutes les étapes de la division, l'abscission doit être **coordonnée dans le temps** avec les autres étapes de la division, notamment avec les événements plus précoces de la cytocinèse. L'abscission, toute dernière étape de la division, est également une étape **irréversible** après laquelle aucun retour en arrière n'est possible. Il est donc essentiel pour les cellules filles de s'assurer que l'abscission n'intervient pas trop tôt. Ces observations laissent donc penser que l'abscission est régulée dans le temps et n'intervient pas à un moment au hasard. Si pour le moment les facteurs déclencheurs de l'abscission sont encore totalement inconnus, quelques exemples de retard ou d'inhibition d'abscission contrôlés offrent des pistes vers la compréhension de la régulation dans le temps de l'abscission.

a. Cytocinèse sans abscission

Quelques exemples décrivent une régulation physiologique de la cytocinèse où l'abscission est complètement inhibée. Même si ces exemples représentent un cas extrême de régulation dans le temps (abscission retardée à l'infini), leur étude peut servir à mieux comprendre les mécanismes de déclenchement de l'abscission ou les facteurs qui retardent l'abscission dans les cas où celle-ci n'est pas complètement inhibée. La **spermatogenèse** chez la souris nécessite une inhibition complète de l'abscission. En effet, les cellules germinales sont connectées par un large pont cytoplasmique formé à la suite d'une division dont l'abscission est inhibée. Ce syncytium peut contenir jusqu'à une centaine de cellules

germinales qui se différencient de façon parfaitement synchrone grâce aux ponts intercellulaires les connectant. La formation de ce pont est essentielle pour la spermatogenèse et la fertilité des souris mâles. Il a été montré que la protéine TEX14 (testis-expressed gene 14) est enrichie au niveau de ces ponts intercellulaires et est essentielle à la formation des ponts (Greenbaum et al., 2006; Greenbaum et al., 2007). Au niveau moléculaire, TEX14 contient un motif GPPX3Y, identique à celui des protéines Alix et Tsg101, qui permet l'interaction avec Cep55. TEX14 entre alors en compétition avec Alix et Tsg101 pour l'interaction avec Cep55 (T. Iwamori et al., 2010). Ainsi, Cep55 ne peut plus se lier à Alix et à Tsg101, ce qui empêche le recrutement des ESCRT-III au pont et inhibe complètement l'abscission (Figure 38).

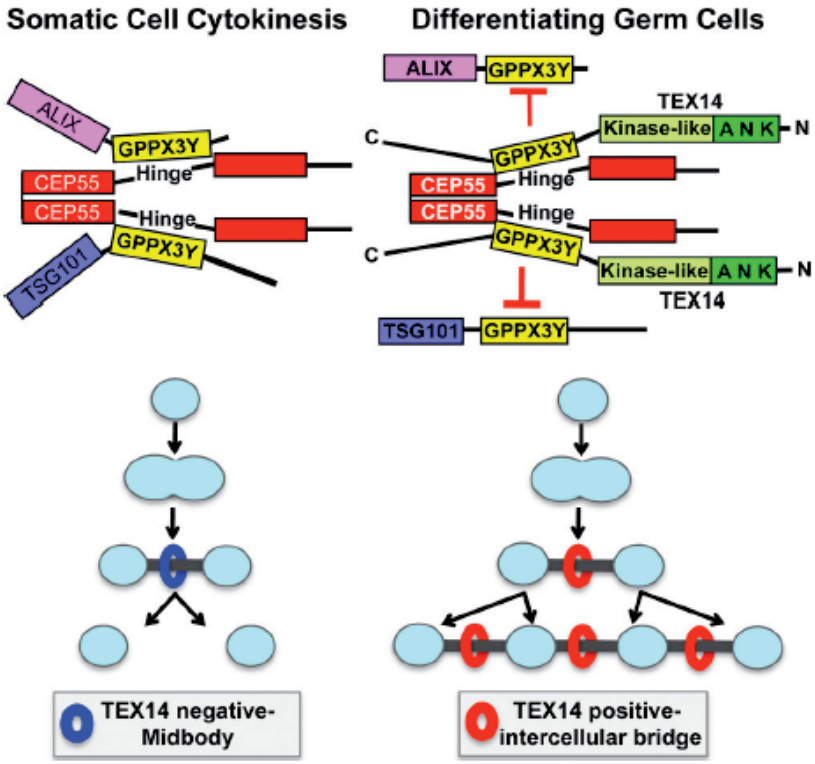


Figure 38 : Modèle de l'inhibition de l'abscission par TEX14 lors de la spermatogenèse
A gauche, déroulement complet de la cytocinèse dans les cellules somatiques. TEXT14 n'étant pas présent au niveau du pont intercellulaire, Cep55 (en rouge) est capable de recruter Alix et Tsg101, qui recrutent à leur tour les ESCRT-III assurant l'abscission. A droite, inhibition de l'abscission dans les cellules germinales. TEX14 (en vert) interagit avec Cep55, empêchant l'interaction entre Cep55 et Alix/Tsg101. Les ESCRT-III ne sont pas recrutés au pont et l'abscission n'a pas lieu. D'après (T. Iwamori et al., 2010).

Lors de l'**ovogenèse** chez la Drosophile, le follicule (ou chambre à œufs, « egg chamber » en anglais) est constitué de 16 cellules : 1 ovocyte et 15 cellules nourricières (Figure 39). Ces 16 cellules, provenant d'une succession de plusieurs mitoses, sont connectées par des ponts cytoplasmiques d'un diamètre de 10 µm environ (Robinson et al., 1994). Ces ponts sont formés par blocage de l'ingression du sillon de division puis sont stabilisés en une structure

particulière en forme d'anneau (le « ring canal » en anglais). Ces canaux assurent une continuité cytoplasmique entre toutes les cellules du follicule, permettant ainsi le transfert de nombreux composants (protéines, ARNm, ou organelles) des cellules nourricières vers l'ovocyte. Même si dans cet exemple l'inhibition de la cytocinèse est assez précoce, il est intéressant de voir que le maintien de ponts cytoplasmiques entre cellules issues d'une division est essentiel au développement de l'ovocyte.

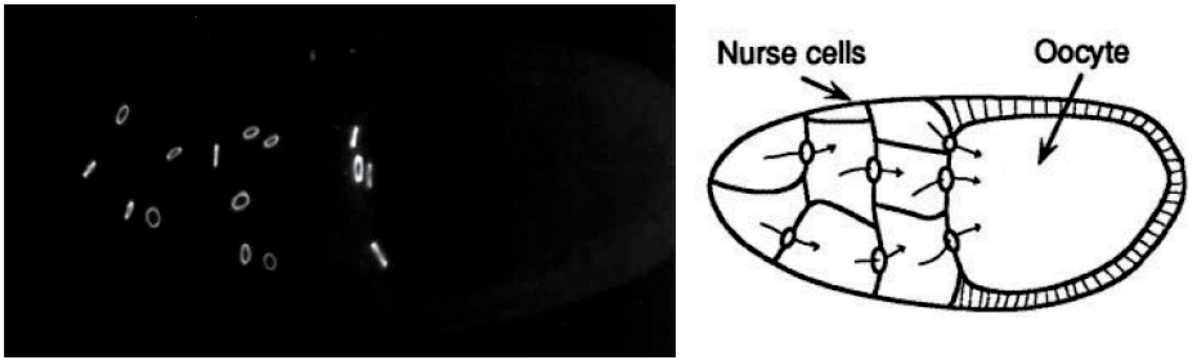


Figure 39 : Ponts cytoplasmiques dans le follicule de Drosophile
A gauche, immunomarquage des canaux intercellulaires (anti Cter-hts). A droite, schéma représentant le follicule ; l'ovocyte et ses cellules nourricières sont reliées par des ponts intercellulaires spécialisés nécessaires au passage de composants des cellules nourricières vers l'ovocyte. Adapté de (Robinson et al., 1994).

b. Le cas des ponts d'ADN : protection contre l'aneuploïdie par AuroraB

Pour assurer l'intégrité du génome lors de la division, il est essentiel que l'abscission n'intervienne qu'une fois les chromosomes séparés. Dans le cas où la ségrégation des chromosomes est incomplète, l'anneau contractile comprime l'ADN non ségrégé se trouvant au centre de la cellule et forme un pont d'ADN dans le pont intercellulaire. Chez la levure bourgeonnante, la voie de signalisation **« NoCut »** inhibe l'abscission lorsqu'un tel pont d'ADN est présent, évitant ainsi la coupure aléatoire de l'ADN qui pourrait engendrer une aneuploïdie (Norden et al., 2006). Cette voie de signalisation dépend de la protéine **Ipl1, homologue de la kinase AuroraB**. Elle protège donc les chromosomes d'une cassure par une abscission prématurée. Cette voie de signalisation a également été décrite chez la cellule animale (Steigemann et al., 2009). Lorsque de l'ADN est détecté dans le pont, un mécanisme de stabilisation du pont intercellulaire permet de retarder l'abscission, donnant ainsi du temps aux cellules filles pour réparer l'erreur de ségrégation des chromosomes. On parle alors de **« abscission checkpoint »**. Sans ce mécanisme de stabilisation, le pont régresse et les deux cellules filles re-fusionnent, l'abscission ne pouvant avoir lieu si de l'ADN est présent dans le pont. Cette stabilisation du pont se fait grâce à une accumulation d'**actine** de chaque côté du pont. La kinase AuroraB est également impliquée dans cette voie de signalisation protectrice en cas de pont d'ADN : **AuroraB** reste active et présente au niveau du midbody, **phosphoryle MKLP1**, ce qui renforce la structure du pont (Figure 40). On peut noter ici que

AuroraB pourrait réguler dans le temps l'abscission même lorsqu'il n'y a pas de pont d'ADN. Comme la phosphorylation de MKLP1 par AuroraB stabilise le pont, on peut supposer que AuroraB doive être inactivée pour permettre l'abscission. En effet, l'inhibition de AuroraB accélère légèrement l'abscission même lorsque les cellules n'ont pas de défaut de ségrégation d'ADN. En revanche, comme le midbody conserve sa structure même après l'abscission, on peut penser que MKLP1 n'a pas forcément besoin d'être inactivée pour autoriser l'abscission. Il se pourrait alors que la régulation dans le temps de l'abscission par AuroraB passe par une autre voie que MKLP1.

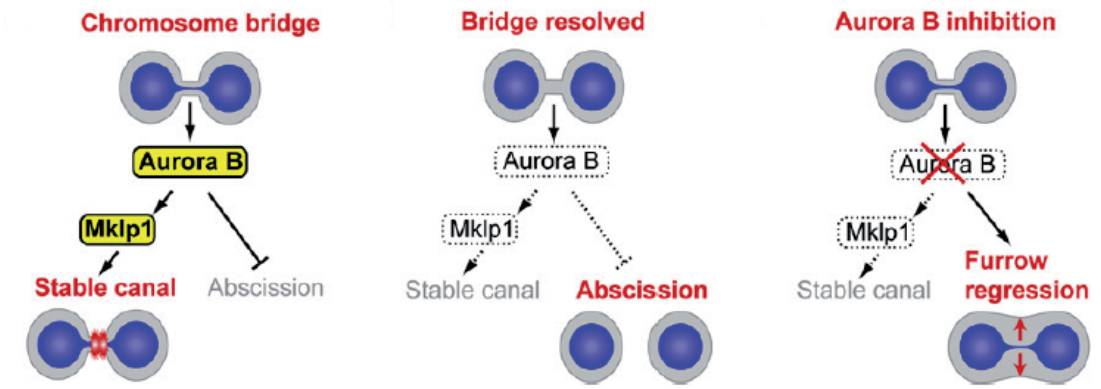


Figure 40 : Modèle de l'inhibition de l'abscission par la présence d'ADN dans le pont intercellulaire
Tant que de l'ADN est présent dans le pont intercellulaire (à gauche), l'abscission est inhibée et le pont stabilisé *via* activation de AuroraB qui phosphoryle MKLP1. Une fois que l'erreur de ségrégation est réparée, l'ADN quitte le pont intercellulaire (au milieu), AuroraB n'est plus activée et l'abscission est autorisée. L'inhibition de AuroraB (à droite) dans le cas d'un pont d'ADN conduit à la régression du sillon de division et à la re-fusion des deux cellules filles. D'après (Steigemann et al., 2009).

Très récemment, une étude a montré que l' « abscission checkpoint » régulé par AuroraB en cas de pont d'ADN agit par l'intermédiaire de **CHMP4C**, un membre du complexe ESCRT-III (Jeremy G Carlton, Anna Caballe, et al., 2012). La déplétion par siRNA de CHMP4C accélère l'abscission, et inversement la surexpression de CHMP4C retarde l'abscission. CHMP4C aurait donc pour rôle de ralentir ou inhiber l'abscission. CHMP4B et CHMP4C, bien qu'étant des isoformes de la même protéine CHMP4, ont des localisations différentes au midbody : CHMP4B est localisé en deux anneaux sur les côtés du midbody, alors que CHMP4C, qui est recruté plus tôt que CHMP4B, se localise d'abord sous forme de deux anneaux comme CHMP4B puis se relocalise vers la région centrale du midbody. Cette localisation centrale en cytocinèse tardive est nécessaire pour retarder l'abscission en cas de pont d'ADN. Les comparaisons de séquence des 3 isoformes de CHMP4 montrent que CHMP4C possède une séquence supplémentaire par rapport à CHMP4A et CHMP4B, la séquence INS, et cette séquence INS est nécessaire pour la localisation de CHMP4C dans la région centrale du midbody. Une séquence consensus pour la phosphorylation par AuroraB est présente dans cette séquence INS et CHMP4C est en effet phosphorylé par AuroraB. Les auteurs proposent alors le modèle suivant **: AuroraB, activée par la présence d'ADN dans le pont, phosphoryle**

la séquence INS de CHMP4C, ce qui permet sa relocalisation au centre du midbody et retarde l'abscission (Figure 41).

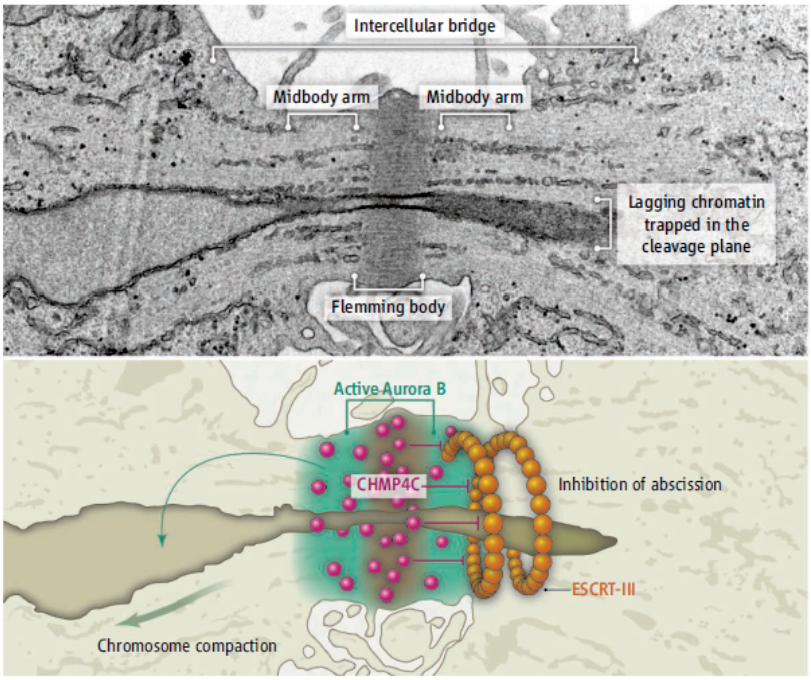


Figure 41 : Modèle de l'inhibition de l'abscission *via* AuroraB et CHMP4C en cas de pont d'ADN
En haut, cliché de microscopie électronique à transmission montrant un pont intercellulaire, son midbody au centre (appelé ici Flemming body), et un pont d'ADN (structure foncée). En bas, représentation schématique de la régulation par AuroraB. AuroraB, activée par la présente d'ADN, phosphoryle CHMP4C qui se relocalise au centre du midbody, inhibant la formation des structures d'ESCRT-III indispensables à l'abscission. AuroraB active également les condensines qui compactent les chromosomes et facilitent le retrait de l'ADN du pont intercellulaire. D'après (M. Petronczki & Uhlmann, 2012).

Cependant, plusieurs questions restent encore sans réponse :

- Comment AuroraB est-elle activée lorsqu'il y a de l'ADN dans le pont ? Les auteurs proposent que AuroraB soit activée au contact de la chromatine, mais comment ?
- Par quel mécanisme CHMP4C, localisé au centre du midbody, empêche-t-il l'abscission ? Pourrait-il empêcher la formation d'un complexe d'ESCRT-III fonctionnel, et si oui comment ?
- Comment l'abscission est-elle autorisée une fois le pont d'ADN résolu ? CHMP4C est-il déphosphorylé et se relocalise-t-il ailleurs au niveau du midbody ?

Une dernière remarque concerne le rôle potentiel de cette régulation au-delà des cas de pont d'ADN. En effet, la déplétion de CHMP4C accélère l'abscission, et ce même dans les cellules sans pont d'ADN. CHMP4C pourrait alors être au centre d'un mécanisme de régulation dans le temps plus général, permettant par exemple la coordination de l'abscission avec d'autres processus : tant que CHMP4C est phosphorylé par AuroraB

l'abscission est inhibée, puis à la suite d'un signal déclencheur CHMP4C n'est plus phosphorylé et l'abscission est autorisée.

c. Coordination entre ingression du sillon et abscission grâce à Plk1

Un autre mécanisme de régulation, dont la kinase Plk1 est l'acteur principal, assure la coordination dans le temps entre la fin de la mitose et l'abscission. Cette fois, cette régulation a lieu dans toutes les cellules et pas uniquement lors de présence anormale d'ADN dans le pont. **Plk1**, ou Polo-like kinase 1, est une kinase mitotique très importante (F. A. Barr et al., 2004). Elle est impliquée lors de l'entrée en mitose, de la maturation des centrosomes, et de l'assemblage du fuseau mitotique. En mitose elle est présente aux centrosomes et aux kinétochores, puis se relocalise au fuseau central en anaphase en s'associant avec la protéine PRC1 (Neef et al., 2007). En sortie de mitose, elle est progressivement dégradée par le complexe APC/Cdh1. Plk1 joue un rôle essentiel dans la régulation dans le temps de l'abscission (Bastos & F. a Barr, 2010). En effet, au cours de la mitose, **Plk1 phosphoryle Cep55**, ce qui l'empêche de se lier à MKLP1 et empêche donc son recrutement au midbody. Une fois que Plk1 est dégradée, elle ne phosphoryle plus Cep55 qui peut alors être recrutée au midbody. Cep55 est essentielle pour le recrutement successif des complexes ESCRT, d'abord Tsg101 et Alix, qui recrutent ensuite les ESCRT-III. Le recrutement trop précoce de Cep55 au midbody (par inhibition de Plk1 par l'inhibiteur BI2536 ou par une mutation de Plk1 la rendant inactive) provoque des ponts anormaux et un échec de l'abscission. Ainsi, **Plk1 active (en mitose) empêche une abscission prématurée en inhibant le recrutement des ESCRT au pont** ; une fois Plk1 dégradée (en fin de mitose) Cep55 peut être recrutée au pont et recruter la machinerie d'abscission (Figure 42). Cette régulation permet de coordonner dans le temps la fin de la formation du pont intercellulaire et le début du processus d'abscission et d'assurer que le recrutement des ESCRT n'intervient que lorsque la contraction de l'anneau est terminée. En effet, la machinerie ESCRT/Spastine induit la coupure des microtubules, et les microtubules sont nécessaires à la stabilisation du pont une fois que l'actine est enlevée. Ainsi, le recrutement prématuré de la machinerie ESCRT/Spastine provoque des défauts de formation du pont intercellulaire.

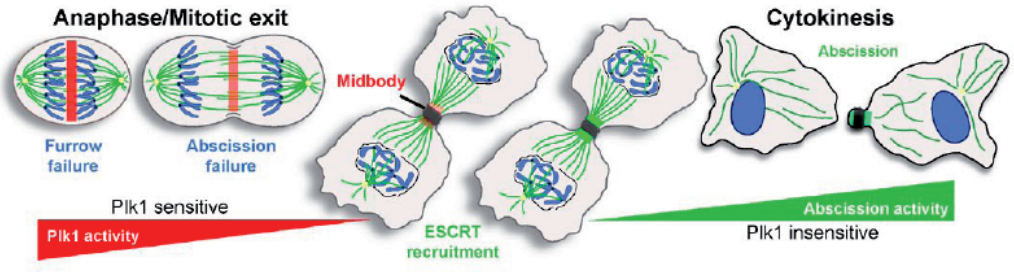


Figure 42 : Modèle de la régulation dans le temps de l'abscission par Plk1
De gauche vers la droite, évolution dans le temps. Plk1 est progressivement dégradée en sortie de mitose, permettant ainsi le recrutement des complexes ESCRT au midbody *via* Cep55 et l'abscission. Voir le texte pour les détails du modèle. D'après (Bastos & F. a Barr, 2010).

d. D'autres exemples de régulation dans le temps moins bien compris

Dans le paragraphe dédié au trafic vésiculaire, j'ai eu l'occasion d'évoquer deux protéines qui **changent de partenaires**, et donc de fonction, au cours de la cytocinèse :

- En début de cytocinèse, **Rab35**, GTPase régulatrice du trafic endosomal, a d'abord pour fonction d'enrichir le pont intercellulaire en PIP2 en apportant la kinase PI5K au niveau du midbody. Ceci est essentiel pour la stabilisation du pont dans les premières phases de sa formation. Par contre, plus tardivement, Rab35 apporte au midbody la phosphatase OCRL qui dégrade le PIP2 et permet le retrait de l'actine du pont, nécessaire à l'abscission.

- **MgcRacGAP** (du complexe Centralspindlin) s'associe au tout début de la cytocinèse avec ECT2, permettant la définition équatoriale du site de clivage et la contraction de l'anneau suite à l'activation de RhoA. Par la suite, MgcRacGAP s'associe préférentiellement avec FIP3, ce qui permet le routage des endosomes de recyclage vers le midbody, essentiel à l'abscission.

Même si on ne comprend pas encore très bien comment ces protéines changent de partenaire au cours de la cytocinèse (Figure 43), ces deux exemples montrent l'importance d'une régulation dans le temps des différentes étapes de la cytocinèse. Ici, on peut penser que ce changement de partenaire assure qu'il y ait d'abord formation du fuseau central (ECT2) et stabilisation du pont intercellulaire (PI5K), puis ensuite seulement trafic vésiculaire dans le pont (FIP3) et retrait des composants stabilisateurs du pont (OCRL).

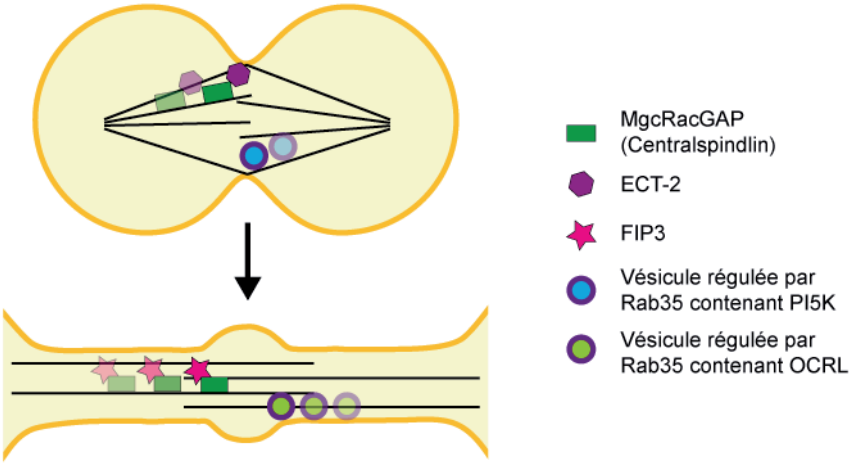


Figure 43 : Deux exemples de changement de partenaire au cours de la cytocinèse

En début de cytocinèse (haut), MgcRacGAP interagit avec ECT2, activant RhoA à la zone équatoriale ; en parallèle, le trafic vésiculaire régulé par Rab35 apporte la kinase PI5K à la membrane plasmique de la zone équatoriale, enrichissant la zone intercellulaire en PIP2. En cytocinèse tardive (bas), MgcRacGAP interagit cette fois avec FIP3, permettant le routage des endosomes de recyclage vers le midbody, nécessaire à l'abscission ; en parallèle, les vésicules régulées par Rab35 apportent cette fois la phosphatase OCRL, permettant la dégradation du PIP2 et le départ de l'actine du pont, nécessaire à l'abscission également.

IV. De la mécanique dans la biologie cellulaire

1. Mécano-sensibilité et mécano-transduction : généralités

a. Définition

Pour commencer ce paragraphe dédié à l'interface entre la mécanique et la biologie, je ne peux m'empêcher de citer Stefano Piccolo, Professeur à l'Université de Padua en Italie, venu donner un séminaire à l'Institut Curie récemment : **« Forces are part of life ! »**. Les cellules, objets biologiques mais aussi physiques, sont en effet capables de sentir les caractéristiques mécaniques de l'environnement dans lequel elles évoluent et d'y répondre. Elles sont également capables en retour d'exercer des forces sur leur environnement. Le terme **« mécanotransduction »** fait référence au processus de **conversion d'un signal mécanique** (des forces extérieures exercées sur la cellule, une propriété mécanique de l'environnement cellulaire, une déformation ou une géométrie) **en un signal biochimique** (une voie de signalisation) **qui permet à la cellule de sentir et de répondre aux propriétés physiques de leur microenvironnement** (pour une revue voir (Christopher S Chen, 2008)). De plus, les signaux mécaniques sont **propagés à l'ensemble de la cellule** *via* le cytosquelette 40 fois plus rapidement que des signaux biochimiques propagés par diffusion, démontrant l'importance des forces au niveau cellulaire (N. Wang et al., 2009; Na et al., 2008).

Les forces ont un rôle évident dans la physiologie de l'organisme. On peut citer comme exemple le renforcement des muscles et des tendons suite à un portage répétitif de poids lourds, et à l'inverse l'atrophie des muscles des astronautes en retour de mission lorsqu'ils ne sont pas soumis à la gravité (Burkholder, 2008). Cette capacité de mécanotransduction est essentielle pour de nombreuses fonctions physiologiques, et une altération de ces capacités, que ce soit un dysfonctionnement du mécanisme senseur de force, un dysfonctionnement de la machinerie de transduction du signal, ou encore des mutations qui modifient les propriétés mécaniques des cellules ou de l'environnement extracellulaire, conduit au développement de certaines maladies : surdité, athérosclérose, dystrophie musculaire et cardiomyopathies, ostéoporose, progression cancéreuse et métastases, etc (pour une revue voir (Jaalouk & Lammerding, 2009)).

En mécanotransduction, on distingue deux types de forces pouvant déclencher une réponse cellulaire :

- Les **forces externes**, générées à l'extérieur de la cellule et qui s'appliquent sur la cellule (une compression ou un étirement par exemple).
- Les **forces internes**, générées par la machinerie contractile de la cellule. Ces forces peuvent alors s'appliquer à la fois sur la cellule qui les produit (forces internes), et sur le tissu environnant ; dans le second cas de figure, le tissu est alors sous contrainte de forces externes.

Dans les deux cas, forces externes et forces internes semblent utiliser la même machinerie cellulaire pour déclencher une réponse au niveau de la cellule : la machinerie contractile acto-myosique, elle-même régulée en amont par des transporteurs d'ions mécanosensibles. En effet, lorsqu'une force externe est appliquée à la cellule, la machinerie contractile s'active pour compenser les forces appliquées. Dans le cas où les forces sont générées par la cellule, la machinerie contractile est inévitablement impliquée dans la réponse cellulaire puisque c'est elle-même qui génère les forces internes.

b. Exemples de mécanotransduction

Aujourd'hui, de nombreux processus physiologiques ou pathologiques impliquant des réactions de mécanotransduction ont été décrits. Seuls quelques exemples seront illustrés ici afin de donner une idée de la variété de ces processus. L'**expression génique** peut être régulée par l'environnement mécanique des cellules : le cytosquelette transmet les forces appliquées en périphérie de la cellule jusqu'au noyau, permettant ainsi une action à distance des forces extracellulaires sur l'organisation du noyau, les voies de signalisations intranucléaires et l'expression des gènes (N. Wang et al., 2009). Au sein d'un épithélium mono-couche, la **prolifération cellulaire** augmente dans les zones où une forte tension est exercée au sein du tissu (Nelson et al., 2005). Durant le développement embryonnaire de la Drosophile, plusieurs voies de mécanotransduction sont décrites comme essentielles à la **morphogenèse** (M. a Wozniak & Christopher S Chen, 2009).

Un autre exemple d'implication de voies de mécanotransduction est celui du phénomène de **« durotaxie »**, ou migration cellulaire dirigée vers les surfaces rigides. Lo et collaborateurs montrent que les cellules NIH 3T3 cultivées *in vitro* sur des substrats de différentes rigidités ont une préférence migratoire vers les substrats plus rigides (Lo et al., 2000). Ils utilisent une surface avec une discontinuité de rigidité ; lorsque les cellules sont du côté souple et qu'elles arrivent au niveau de la zone rigide, elles s'étalent d'avantage, forment un lamellipode sur la surface rigide et migrent vers la zone rigide ; au contraire, lorsque les cellules sont sur la zone rigide et arrivent au niveau de la zone souple, elles changent de direction et restent sur la zone rigide, évitant soigneusement d'aller sur la zone souple.

Un dernier exemple particulièrement intéressant est celui du rôle de la mécanotransduction dans la **différenciation cellulaire**. Engler et collaborateurs ont montré que des cellules souches mésenchymales naïves se différencient en différents types cellulaires en fonction de la rigidité du substrat sur lequel elles sont cultivées (Engler et al., 2006). Dans l'organisme, les organes présentent des rigidités différentes : les os sont bien plus rigides que les muscles, eux-mêmes plus rigides que le cerveau. Il est vraiment étonnant de voir que ces cellules souches, sans aucun facteur de différenciation dans leur milieu de culture, se différencient en neurones lorsque la rigidité du substrat est comparable à la rigidité du cerveau, en myoblastes lorsque la rigidité est comparable à celle des muscles, et en ostéoblastes lorsque la rigidité mime celle des os (Figure 44).

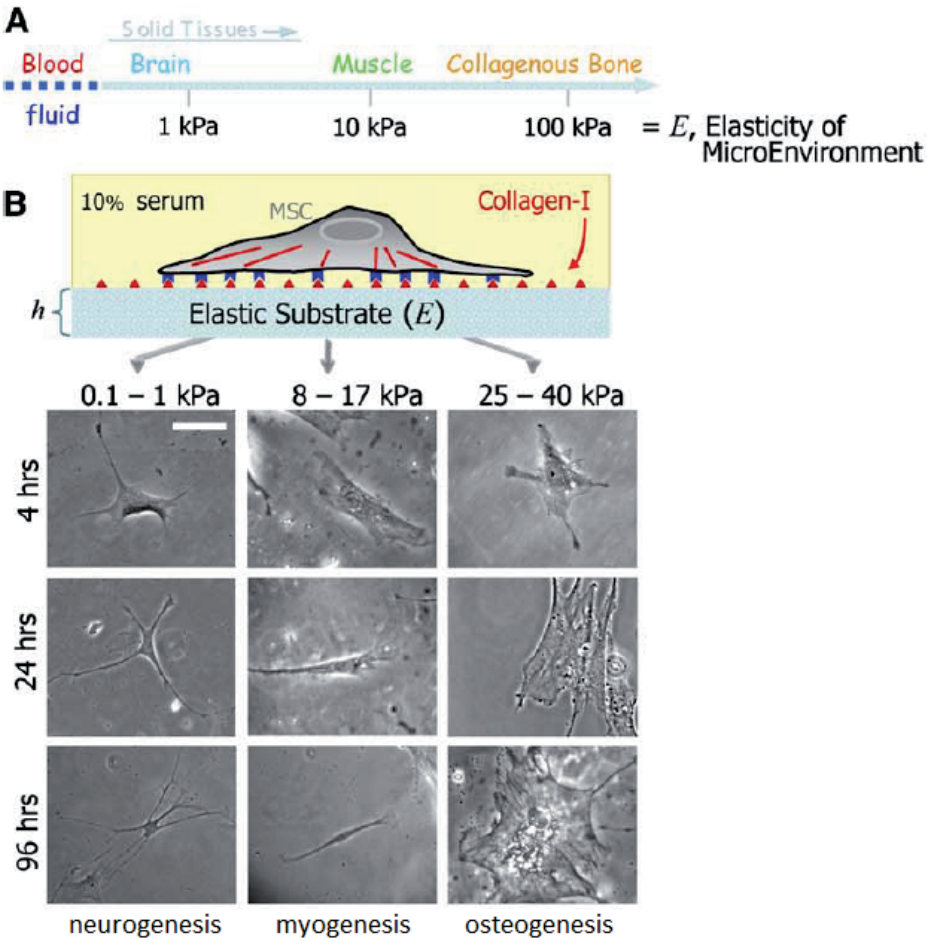


Figure 44 : Différenciation des MSCs en fonction de la rigidité du substrat de culture

A) Rigidités des différents tissus de l'organisme, exprimées en kiloPascals (kPa). B) Culture de cellules souches mésenchymales (MSCs) sur des substrats de différentes rigidités mimant la rigidité du cerveau (gauche), des muscles (milieu) et des os (droite). Après seulement 24h, les cellules commencent à acquérir des caractéristiques de neurones, de myoblastes ou d'ostéoblastes en fonction de la rigidité de leur substrat. D'après (Engler et al., 2006).

2. Machineries cellulaires impliquées dans la mécanotransduction

Quand on réfléchit aux mécanismes cellulaires permettant la traduction d'un signal mécanique en un signal biochimique, la première question que l'on se pose est la suivante : comment les cellules « sentent-elles » une propriété physique ? ou plus simplement : comment les cellules « sentent-elles » une **tension** ? En effet, il est montré qu'une tension exercée sur une cellule peut provoquer une réaction biochimique intracellulaire, et ce de différentes façons :

- *Via* des **molécules mécano-sensibles**, c'est-à-dire des molécules (essentiellement des protéines) qui sont intrinsèquement sensibles à la tension et initient une cascade de signalisation lorsqu'une tension leur est appliquée. Plusieurs exemples de protéines mécanosensibles sont maintenant bien décrits : les transporteurs d'ions de la membrane plasmique, la taline des adhésions focales, l'α-caténine des jonctions cellule-cellule, ou encore la myosine-I. Au niveau moléculaire, la tension induit généralement un changement conformationnel de la molécule, qui se traduit alors par différents phénomènes :
    - un changement d'état ou d'activité de la molécule, par exemple l'ouverture d'un canal ionique ou la phosphorylation de sites spécifiques exposés suite à un dépliement de la protéine
    - un changement d'affinité pour ses partenaires, par exemple par exposition de nouveaux sites d'interaction grâce au dépliement de la protéine
- En **modifiant directement l'interaction entre deux partenaires**, par exemple en éloignant une enzyme de son substrat. La régulation de la phosphorylation du réseau KMN par la kinase AuroraB au niveau des kinétochores en est un exemple.
- *Via* la modification de la **tension membranaire**, qui ensuite agit soit physiquement sur certains processus comme l'endocytose, soit indirectement *via* d'autres voies de signalisation.

La détection primaire d'une tension n'est que le début de la réponse de mécanotransduction. En effet, il faut ensuite que ce signal soit propagé *via* des voies de signalisations spécifiques pour aboutir à une réponse cellulaire. Dans ce paragraphe, je propose d'exposer quelques cas de mécanotransduction impliquant en particulier la machinerie contractile de la cellule ou la tension de membrane.

a. Réponse à la rigidité du substrat

La rigidité d'un matériau est caractérisée par sa raideur qui désigne sa résistance à la déformation élastique. La raideur est définie par le module d'élasticité (ou module de Young

noté E) : grandeur intrinsèque du matériau, c'est une constante reliant la contrainte appliquée et la déformation élastique provoquée par cette contrainte (l'unité est le Pascal). Ainsi, plus le substrat est rigide, plus la cellule doit fournir un effort important pour le déformer, et inversement, plus le substrat est souple, plus il y est facile de le déformer. En biologie cellulaire, l'utilisation d'hydrogels de polyacrylamide est une technique très courante permettant de contrôler finement la rigidité de l'environnement des cellules. Ces hydrogels bio-compatibles et transparents peuvent être utilisés directement comme substrat de culture ou être traités par différentes protéines de matrice extracellulaire pour permettre l'adhésion des cellules. Cette technique a permis de nombreuses avancées dans l'étude de la réponse cellulaire en fonction de la rigidité de l'environnement.

Il a été montré que les cellules **génèrent des forces** plus importantes lorsqu'elles sont cultivées sur un substrat rigide que lorsqu'elles sont cultivées sur un substrat souple (Lo et al., 2000). La génération de ces forces internes est dépendante de la **machinerie contractile acto-myosique cellulaire**. Dans les cellules souches mésenchymateuses, la myosine-II est surexprimée lorsque les cellules se trouvent sur un substrat rigide, alors qu'elle est sous-exprimée lorsque les cellules sont sur un substrat souple (Engler et al., 2006). Plus généralement, l'augmentation de rigidité du substrat induit une activation de la myosine-II par augmentation de l'activité de la **GTPase RhoA** (M. A. Wozniak et al., 2003). Ainsi, une forte rigidité de l'environnement cellulaire active la machinerie contractile intracellulaire *via* la voie de signalisation RhoA, puis **ROCK** (ou Rho Kinase) qui phosphoryle la chaîne régulatrice de la myosine-II et l'active. Il a été montré également que l'augmentation de la rigidité du substrat stabilise les **adhésions focales**, qui sont alors plus nombreuses et plus matures sur substrats rigides (Engler et al., 2006). Cela provient entre autre d'une propriété particulière des adhésions focales qui nécessitent une certaine résistance du substrat pour atteindre un niveau de maturité complet, la mise sous tension des adhésions focales favorisant leur maturité. Enfin, la rigidité du substrat régule également la **morphologie cellulaire** : sur substrat souple, les cellules sont arrondies alors qu'elles sont très étalées sur substrat rigide (différence typique entre culture sur boîte en plastique et culture sur gel ou substrat plus souple). La Figure 45 montre l'augmentation du nombre des adhésions focales et des fibres d'actines avec l'augmentation de la rigidité du substrat.

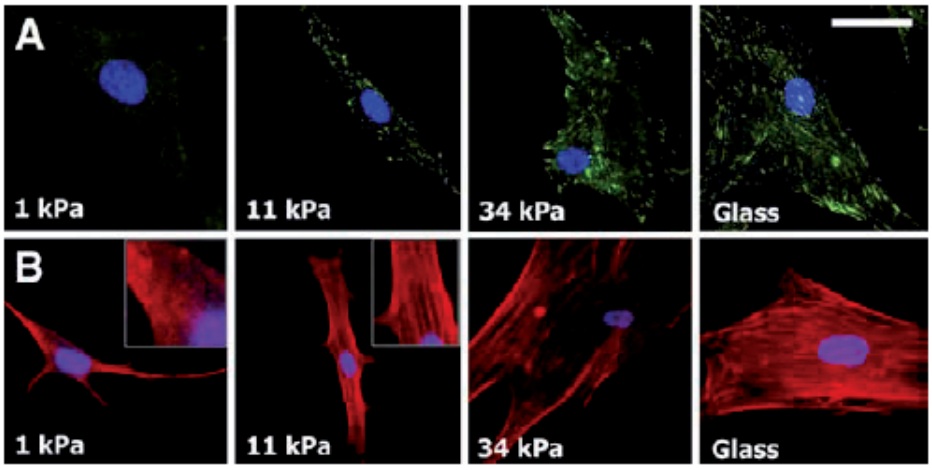


Figure 45 : Effets de la rigidité du substrat sur l'organisation cellulaire

A) Morphologie des adhésions focales (Paxiline) dans des cellules cultivées sur des substrats de différentes rigidités : quasiment inexistantes sur substrat très souple (1 kPa, équivalent de la rigidité dans le cerveau); un peu plus nombreuses et mieux organisées (points) sur substrat plus rigide (11 kPa, équivalent de la rigidité dans le muscle); beaucoup plus nombreuses, longues et rectilignes sur substrat rigide (34 kPa, équivalent de la rigidité des os). B) Organisation de l'actine dans les cellules cultivées sur les même substrats : diffuse sur gel souple, et de plus en plus organisée en fibres sur les gels de plus en plus rigides, jusqu'à former des fibres de stress. A) et B) Marquage de l'ADN en bleu, échelle 20 µm. D'après (Engler et al., 2006).

Il est intéressant de voir que la même machinerie est impliquée lorsque des **forces externes** sont appliquées aux cellules. En effet, l'**étirement** des cellules active RhoA et recrute la myosine-II de façon ROCK-dépendante, stabilise les adhésions focales, et induit la formation de fibres de stress d'actine (Figure 46) (Torsoni et al., 2005; Yoshigi et al., 2005).

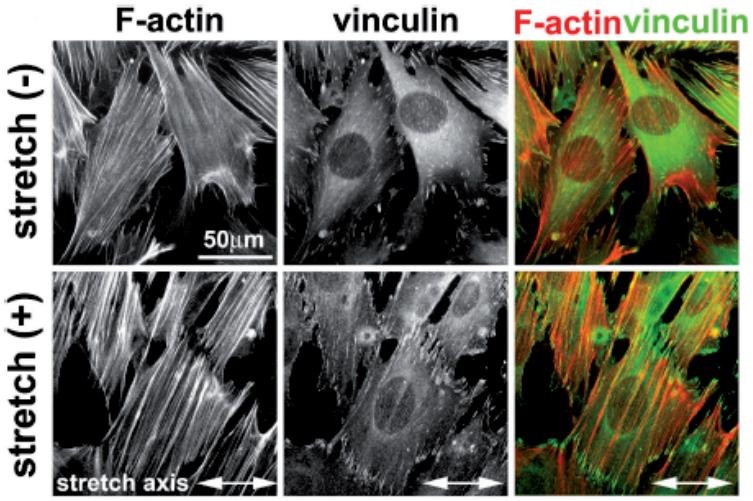


Figure 46 : Réponse des cellules soumises à un étirement

En haut, fibroblastes sur membrane non étirée, en bas fibroblastes soumis à un étirement cyclique uni-axial (1h à 15% et 0,5 Hz). Marquage de l'actine et de la vinculine (protéine des adhésions focales). L'étirement provoque la formation de fibres de stress d'actine et un ré-enforcement des adhésions focales. D'après (Yoshigi et al., 2005).

b. Réponse à la géométrie des adhésions cellule-substrat

La technique des micro-motifs adhésifs permet de contrôler la surface d'étalement, la surface d'adhésion et la géométrie des adhésions de cellules cultivées en 2D (îlots de protéine adhésive de taille et de forme au choix). En 1997, Chen et collaborateurs montrent que l'étalement cellulaire contrôle la **survie** ou la **mort par apoptose** des cellules (C. S. Chen et al., 1997). Ils utilisent des micro-motifs de différentes surfaces pour montrer qu'en dessous d'une certaine surface d'étalement les cellules meurent par apoptose. Ils utilisent également des micro-motifs en forme de points pour diminuer la quantité d'adhésion tout en gardant une surface d'étalement importante (la cellule s'étalant à cheval sur plusieurs points adhésifs) et montrent ainsi que la **surface d'étalement**, et non la surface d'adhésion, contrôle la survie cellulaire.

L'étalement cellulaire contrôle également la **machinerie contractile acto-myosique**. En effet, les cellules génèrent une force plus importante lorsqu'elles sont plus étalées (J. L. Tan et al., 2003). Comme la réponse à un substrat rigide ou à l'application d'une force externe, la réponse à l'étalement cellulaire dépend de la myosine-II et de sa kinase activatrice ROCK (Pitaval et al., 2010). Pitaval et collaborateurs montrent que la myosine-II est plus phosphorylée (donc active) dans des cellules cultivées sur de larges disques de fibronectine que dans des cellules cultivées sur des disques plus petits (Figure 47), et l'inhibition de ROCK par l'inhibiteur Y27632 abolit cette phosphorylation de la myosine-II.

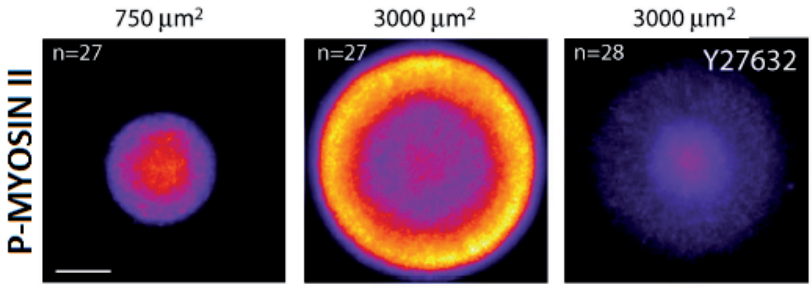


Figure 47 : Augmentation de la contractilité cellulaire avec la surface d'étalement
Cellules cultivées sur des disques adhésifs de différentes tailles et immunomarquées pour la phospho-myosine-II. A droite, traitement par Y27632, inhibiteur de ROCK. Les images représentent la moyenne de plusieurs cellules (n), le code couleur (fire look-up table) amplifie les variations d'intensité. Echelle 5 µm. D'après (Pitaval et al., 2010).

Enfin, la **géométrie des adhésions** peut également contrôler la contractilité cellulaire. Une cellule étalée sur un motif comportant un bord rectiligne développe une fibre de stress d'actine contractile au niveau du bord rectiligne. De plus, s'il y a juxtaposition de zones adhésives et de zones non-adhésives au sein du motif, la cellule renforce ses adhésions focales de part et d'autre de la zone non-adhésive et tend une fibre de stress très contractile pour couvrir cette zone non adhésive (M. Théry, A. Pépin, et al., 2006). La Figure 48 illustre

cette modulation de contractilité cellulaire en fonction de la taille et de la géométrie des adhésions cellule-substrat.

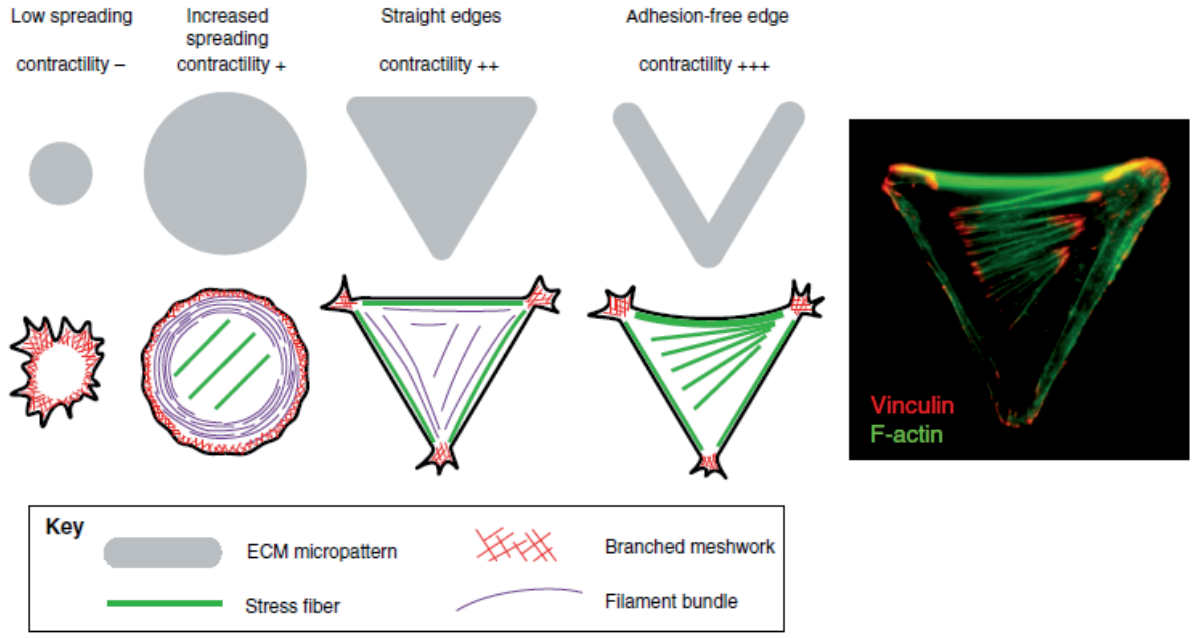


Figure 48 : Effet de la géométrie des adhésions au substrat sur l'architecture et la contractilité cellulaires
De gauche à droite : i) confinée à une petite surface, la cellule assemble préférentiellement un réseau d'actine branchée ; ii) sur une surface discoïdale plus importante, la cellule forme des fibres d'actine à la périphérie du disque et quelques fibres de stress au centre ; iii) des bords rectilignes induisent la formation de fibres de stress contractiles, iv) une forme en V, contenant une zone non adhésive, augmente encore la contractilité de la fibre de stress tendue au-dessus de la zone non-adhésive. L'image de droite montre une cellule étalée sur une forme en V avec la fibre de stress (actine en vert) très contractile, et le renforcement des adhésions focales (vinculine en rouge) de part et d'autre de cette fibre de stress. D'après (Manuel Théry, 2010).

Conditions environnementales		Substrat souple	Substrat rigide
		Etalement faible	Etalement fort
		Pas d'étirement	Etirement
Réponse cellulaire	Contractilité	Myosine-II -	Myosine-II +
		ROCK -	ROCK +
		RhoA -	RhoA +
	Adhésions focales	immatures	matures
	Morphologie cellulaire	arrondie	étalée

Table 2 : Situations équivalentes en terme de réponse cellulaire

On voit ici que les **mécanismes de réponse** à la **rigidité du substrat** et à la **géométrie des adhésions** impliquent les mêmes voies cellulaires, notamment la contractilité (Table 2). Récemment, un autre mécano-effecteur a été identifié lors de ces réponses de mécanotransduction : il s'agit de **YAP/TAZ** (Dupont et al., 2011). YAP et Taz sont des co-activateurs de transcription de la voie Hippo, impliquée notamment dans le contrôle de la taille des organes. Il est montré que lorsque les cellules sont cultivées sur substrat rigide,

YAP/TAZ est localisé dans le noyau, alors que lorsque les cellules sont cultivées sur un substrat souple, YAP/TAZ n'est pas localisé dans le noyau mais dans le cytoplasme, rendant la tâche de co-activateur de transcription impossible à réaliser. La mesure de l'activité de YAP/TAZ (*via* la quantification de l'expression de gènes spécifiquement régulés par YAP/TAZ) montre en effet que la localisation de YAP/TAZ corrèle avec son activité : inactif dans le cytoplasme, et actif dans le noyau. D'autres expériences (résumées dans la Table 3 et illustrées dans la Figure 48) montrent que la réponse à la géométrie de l'adhésion cellule-substrat (en terme de surface d'étalement et de surface d'adhésion) induit également un changement de localisation de YAP/TAZ : localisé au cytoplasme lorsque la surface d'étalement est faible, et au noyau lorsque la surface d'étalement (et ce quelle que soit la surface d'adhésion) est importante. De façon intéressante, la localisation de YAP/TAZ au noyau est dépendante de la voie RhoA/ROCK/myosine-II : l'inhibition de la myosine-II par la blebbistatine, de ROCK par Y27632, et de RhoA par C3 empêchent la localisation de YAP/TAZ au noyau, alors que la dépolymérisation des microtubules par le nocodazole n'a aucun effet.

Localisation de YAP/TAZ	
Cytoplasme	Noyau
Substrat souple	Substrat rigide
Micro-pilliers flexibles (peu d'adhésions)	Micro-pilliers raides (peu d'adhésion)
Micro-motif de petite taille	Micro-motif de grande taille
	Micro-motif en réseau de points : surface d'étalement importante mais surface d'adhésion faible

Table 3 : Localisation de YAP/TAZ en fonction de l'environnement cellulaire
Etude de (Dupont et al., 2011)

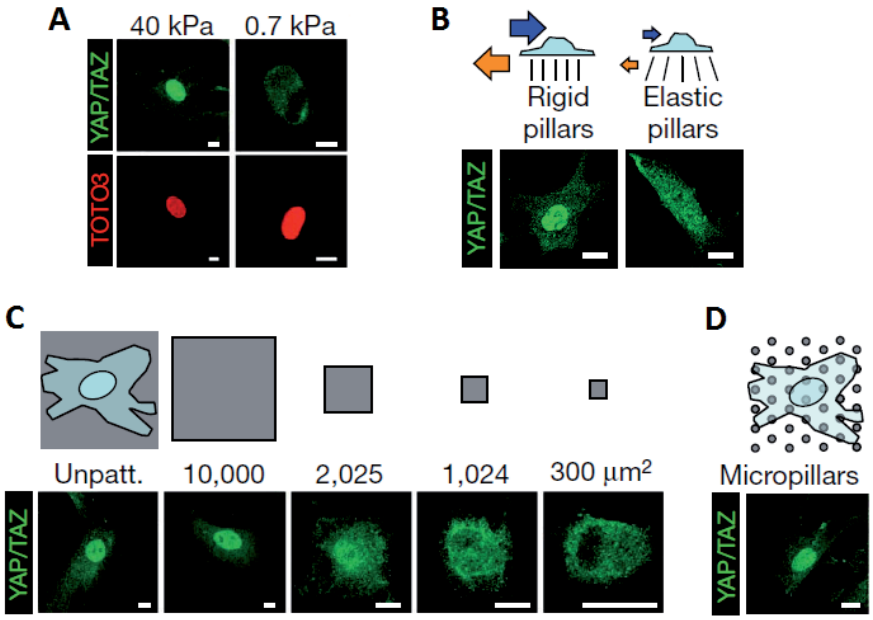


Figure 49 : YAP/TAZ est localisé au noyau ou au cytoplasme en fonction de l'environnement extracellulaire
Images confocales d'immunomarquage de YAP/TAZ (et marqueur nucléaire TOTO3 le cas échéant) de cellules souches mésenchymales humaines cultivées sur différents substrats : A) hydrogel rigide (gauche) ou souple (droite), B) micropilliers rigides ou souples, C) micro-motifs adhérents de surfaces variables, D) réseau de micro-motifs ponctuels permettant une surface d'étalement importante avec une surface d'adhésion minimale. Adapté de (Dupont et al., 2011).

c. Rôles de la tension de membrane

Des études récentes montrent que la tension de membrane peut également jouer un rôle essentiel dans la régulation du comportement cellulaire. La tension de membrane a deux origines : la tension au sein de la bicouche lipidique et l'adhésion de la membrane avec le cytosquelette (essentiellement le cortex cellulaire acto-myosique). Ainsi, la tension de membrane est impliquée dans des processus cellulaires variés où la déformation de la membrane est nécessaire : migration cellulaire (extensions cytoplasmiques au front de migration), mitose et cytocinèse (ingression du sillon de division), trafic intracellulaire (endocytose, exocytose).

Lors de l'**étalement** des fibroblastes, la tension de membrane coordonne le trafic membranaire et la contractilité acto-myosique (Gauthier et al., 2011). Après une première phase d'étalement, la tension de membrane augmente temporairement lorsque tous les réservoirs de membranes ont été utilisés. Cette augmentation de tension de membrane active alors la machinerie contractile de la cellule et la sécrétion par exocytose, permettant à la cellule de disposer de d'avantage de membrane pour continuer à s'étaler.

La tension de membrane régule également la **motilité cellulaire** de plusieurs façons. Batchelder et collaborateurs proposent que la tension de membrane régule l'**organisation du lamellipode** des cellules spermatiques de *C. elegans* (Batchelder et al., 2011). En modulant la tension de membrane (choc osmotique et détergent doux), ils observent qu'une

augmentation de tension de membrane augmente la motilité des cellules et qu'inversement une diminution de la tension diminue la vitesse de déplacement des cellules. Ils montrent également que la tension de membrane a un effet sur la polymérisation de la protéine MSP (Major Sperm Protein), équivalent de l'actine dans ces cellules. Une augmentation de la tension de membrane induit une polymérisation dans l'axe de la migration, avec des filaments plus longs et un lamellipode bien organisé, alors qu'une faible tension de membrane provoque la désorganisation du lamellipode avec des fibres courtes et non orientées. De plus, Houk et collaborateurs montrent que la tension de membrane participe à la régulation de la migration des neutrophiles *via* la régulation de la **GTPase Rac** (Houk et al., 2012). Les auteurs montrent que le front de migration pourrait inhiber l'activité migratoire dans le reste de la cellule *via* une augmentation de la tension de membrane. En effet, lors de l'étalement du pseudopode (front de migration large), la tension de membrane double, et cette augmentation de tension de membrane est suffisante pour inhiber l'assemblage de l'actine et inhiber Rac (impliquée dans la formation du pseudopode). Ce mécanisme permet à la cellule de conserver un unique front de migration, une polarisation très forte et une migration efficace.

Une autre étude montre que la tension de membrane agit sur l'assemblage et le désassemblage des **caveolae** pour ajuster la quantité de membrane plasmique disponible (Sinha et al., 2011). Les caveolae sont des invaginations au niveau de la membrane plasmique. Lors d'une augmentation de la tension de membrane (soit par choc osmotique qui fait gonfler la cellule, soit par étirement), les caveolae disparaissent en fusionnant avec la membrane plasmique, apportant ainsi de la nouvelle membrane à la membrane plasmique. Au contraire, lorsque la tension diminue, les caveolae se reforment, diminuant la quantité de membrane disponible pour la membrane plasmique. Ainsi, la cellule est capable de s'adapter à un stress mécanique en ajustant sa quantité de membrane plasmique, utilisant les caveolae comme réservoir de membrane.

Enfin, d'autres effets de la tension de membrane ont été reportés. Comme décrit précédemment dans le paragraphe sur la Dynamine, la tension de membrane régule l'**endocytose** et l'**exocytose** : une augmentation de la tension de membrane bloque l'endocytose (Dai et al., 1997), alors qu'une baisse de la tension de membrane augmente le taux d'endocytose (Raucher & Sheetz, 1999).

3. Forces et cytocinèse

L'anneau contractile de cytocinèse est un système générateur de forces qui a fait l'objet de nombreuses études biophysiques : comment l'anisotropie du cortex cellulaire positionne l'anneau, par quels mécanismes l'anneau se contracte-t-il, comment un système mécanosensible assure les changements de formes de la cellule au cours de la cytocinèse (pour une revue, voir (Effler et al., 2007), ou encore quel est le rôle du cortex polaire lors de

la cytocinèse (Sedzinski et al., 2011). Une étude de la rigidité cellulaire par Microscopie à Force Atomique (ou AFM, technique décrite plus loin) a permis de montrer notamment que le cortex cellulaire se rigidifie au niveau de l'équateur juste avant l'ingression du sillon de division (Figure 50) (Matzke et al., 2001).

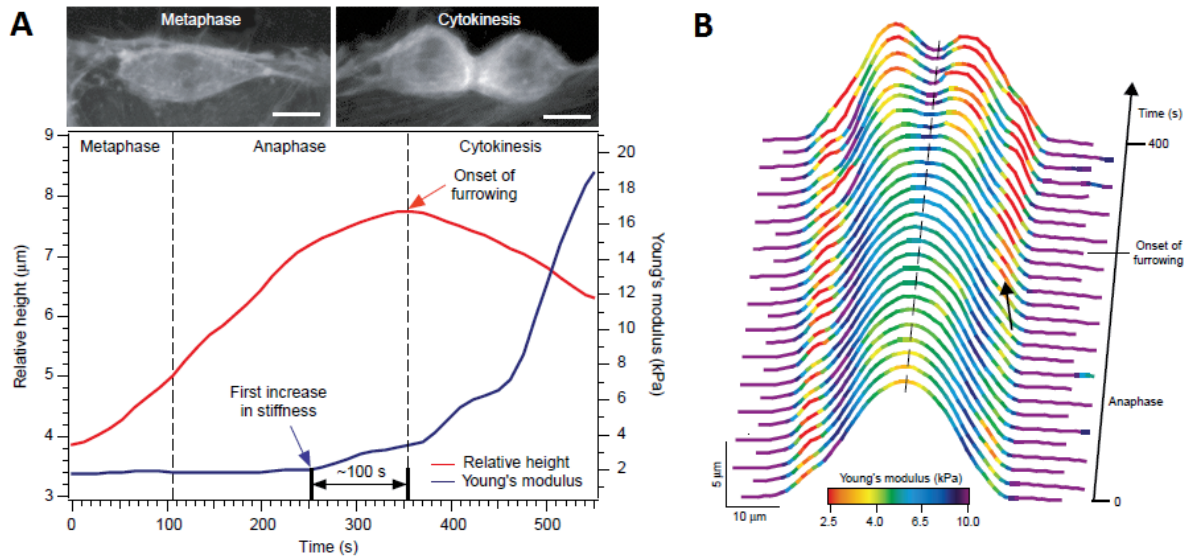


Figure 50 : Etude de la cytocinèse au moyen de l'AFM

A) Utilisation de l'AFM (microscopie à force atomique) pour mesurer l'évolution de la hauteur de la cellule (en rouge) et de la rigidité cellulaire (en bleu) au cours de la cytocinèse. Les étapes de métaphase, anaphase, et ingression du sillon de division sont précisées par les pointillés. En haut, immunomarquage de l'actine dans les cellules Ptk2. On peut noter que ces cellules ne s'arrondissent pas totalement lors de la mitose. B) Evolution au cours du temps (de l'avant vers l'arrière) de la hauteur pôle-à-pôle ainsi que de la rigidité cellulaire (code couleur). On remarque l'augmentation de rigidité de l'équateur lors de la cytocinèse (sillon violet). D'après (Matzke et al., 2001).

Cependant, un nombre très limité d'études se sont attachées à mesurer les forces et à comprendre leur implication dans la fin de la cytocinèse. A ma connaissance, la seule étude mesurant les forces au cours de la cytocinèse, et ce jusqu'à la séparation complète des cellules filles lors de l'abscission, est celle réalisée par Burton et Taylor en 1997 (Burton & Taylor, 1997). Au moyen d'un substrat de silicone très flexible, les auteurs ont mesuré les forces exercées par les cellules au cours de la cytocinèse en observant les plis formés par ce substrat sous l'effet des forces appliquées (Figure 51). Ils montrent notamment que les cellules exercent des forces de traction lors du début de la cytocinèse et que ces forces persistent lors du réétalement des cellules filles. En effet, ils observent des plis très importants entre les deux cellules filles lors de leur réétalement, signe que les cellules tirent sur le substrat dans des directions opposées. Ils proposent d'ailleurs que ces forces soient impliquées dans la rupture du pont intercellulaire par traction. Au contraire de cette théorie de rupture du pont, mes travaux de thèse montrent que les mécanismes mis en jeux lors de l'abscission (coupure des microtubules et fission de la membrane) nécessitent une relâche de tension dans le pont.

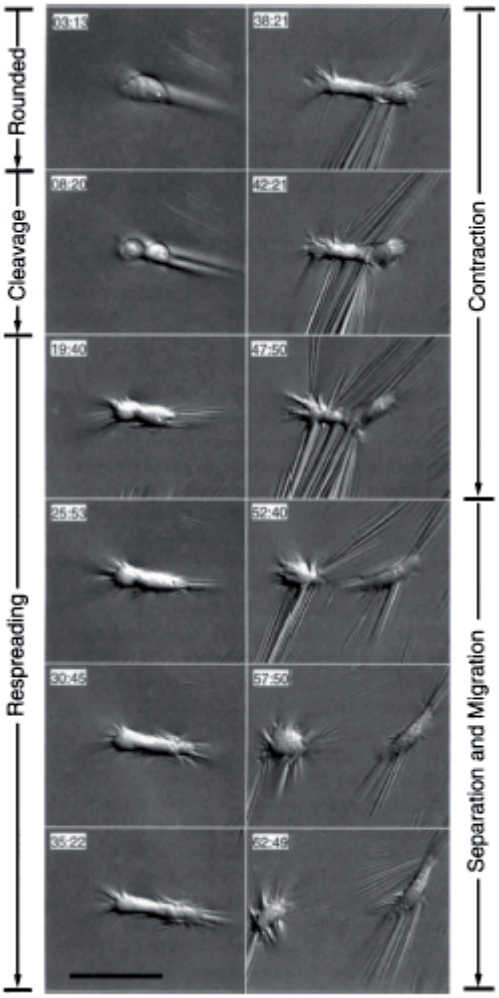


Figure 51 : Forces de traction lors du réétalement post-mitotique des cellules filles
Images en lumière transmise (DIC) de fibroblastes 3T3 se divisant sur un substrat de silicone. Evolution du temps de haut en bas puis de gauche à droite, échelle 80 µm. D'après (Burton & Taylor, 1997).

Objectifs

Jusqu'à présent, la régulation dans le temps de l'abscission a essentiellement été étudiée lors d'une mauvaise ségrégation de l'ADN, provoquant des ponts d'ADN dans le pont intercellulaire. Mais au sein d'une population cellulaire, ce cas de figure ne représente qu'un faible pourcentage. Aussi, comment l'abscission est-elle contrôlée dans le temps lorsque la ségrégation de l'ADN ne présente pas de défaut ? Quels sont les facteurs, internes ou externes aux cellules, qui induisent l'abscission ou au contraire la retarde ? Le but de mon travail de thèse a été d'étudier la **régulation temporelle de l'abscission** en identifiant et caractérisant les facteurs capables de retarder ou d'accélérer l'abscission.

Je me suis concentrée sur le **rôle du micro-environnement cellulaire** sur la régulation temporelle de l'abscission, en particulier sur le rôle des paramètres suivants : adhésion cellulaire, motilité, contractilité, forces exercées par les cellules filles au cours de la cytocinèse au niveau du pont intercellulaire. Plusieurs études proposent que les forces de traction exercées au niveau du pont favorisent l'abscission par rupture du pont. Or l'étude de l'abscission au moyen de Tubuline fluorescente a montré une coupure du pont très nette et très reproductible, incompatible avec un modèle de rupture du pont. De plus, des observations antérieures à mes travaux de thèse ont plutôt suggéré qu'une tension au niveau du pont retarderait ou empêcherait l'abscission au lieu de la faciliter.

Il semblerait donc que l'environnement mécanique des cellules filles pourrait être un facteur clé de la régulation de l'abscission. Afin d'étudier son rôle sur la régulation de l'abscission, j'ai utilisé une combinaison d'approches originales. J'ai en particulier développé des méthodes permettant de contrôler le confinement spatial des cellules filles, de mesurer les forces exercées par les cellules filles au cours de la cytocinèse, et de micro-manipuler le pont intercellulaire pour moduler la tension exercée dans le pont. Ces outils m'ont permis de proposer un modèle selon lequel une tension dans le pont intercellulaire retarde l'abscission, et au contraire une relâche de tension induit l'abscission. De plus, cette régulation temporelle s'effectue *via* les complexes ESCRT, machinerie moléculaire centrale de l'abscission.

Développements méthodologiques

Le but de ce chapitre est de décrire les méthodes développées au cours de ma thèse afin d'adapter des techniques existantes à l'étude de la division cellulaire, en particulier de la cytocinèse. Les points principaux, détaillés dans les paragraphes suivants, sont le suivi au cours du temps de la cytocinèse et de l'abscission, le contrôle de l'environnement des cellules filles, la perturbation de cet environnement par micromanipulation, et la mesure des forces exercées par les cellules filles.

Les précisions concernant les expériences publiées dans l'article sont présentées dans les informations supplémentaires de l'article section « Materials and Methods ».

Les détails pratiques des différentes techniques sont présentés dans la section « Protocoles » des Annexes à la fin de ce mémoire.

I. Etude dynamique de la cytocinèse et de l'abscission

1. Comment observer l'abscission ?

L'abscission est un événement cellulaire difficile à observer, en particulier lorsque les cellules filles sont proches l'une de l'autre. En microscopie en lumière transmise, les techniques de contraste de phase et de DIC (Differential Interference Contrast) peuvent améliorer la visualisation du pont intercellulaire lorsque celui-ci est bien séparé des cellules filles, mais la coupure du pont reste quasiment impossible à déterminer lorsque les cellules sont accolées. L'une des premières techniques utilisées pour déterminer si l'abscission a eu lieu ou non repose sur la **diffusion d'un colorant** micro-injecté dans l'une des deux cellules filles vers sa sœur : le colorant passe d'une cellule à l'autre par le pont si celui-ci est intact, alors que si l'abscission a déjà eu lieu au moment de l'injection, le colorant ne peut plus diffuser (Schulze & Blose, 1984; J. M. Sanger et al., 1985). Des techniques d'**électrophysiologie** ont également été utilisées afin de tester la continuité électrique entre les deux cellules filles (Larkin & Danilchik, 1999). Plus récemment, Steigemann et collaborateurs ont adapté la technique de la diffusion d'un colorant d'une cellule fille à l'autre afin de la rendre plus quantitative et de permettre un suivi en dynamique tout au long de la cytocinèse (Steigemann et al., 2009). En utilisant des cellules exprimant de la **GFP photo-activable** (PA-GFP), ils activent la PA-GFP par illumination laser dans une seule des deux cellules filles et mesurent la fluorescence dans l'autre cellule fille, la fluorescence mesurée dans cette seconde cellule provenant uniquement de la PA-GFP activée dans la première cellule qui diffuse par le pont intercellulaire (Figure 52A). Ainsi, au cours de la cytocinèse, lorsque la PA-GFP est

continuellement activée dans la première cellule, la fluorescence dans la seconde cellule augmente petit à petit, jusqu'à atteindre un plateau au moment où le pont est coupé et où la source de fluorescence n'est plus disponible (Figure 52B).

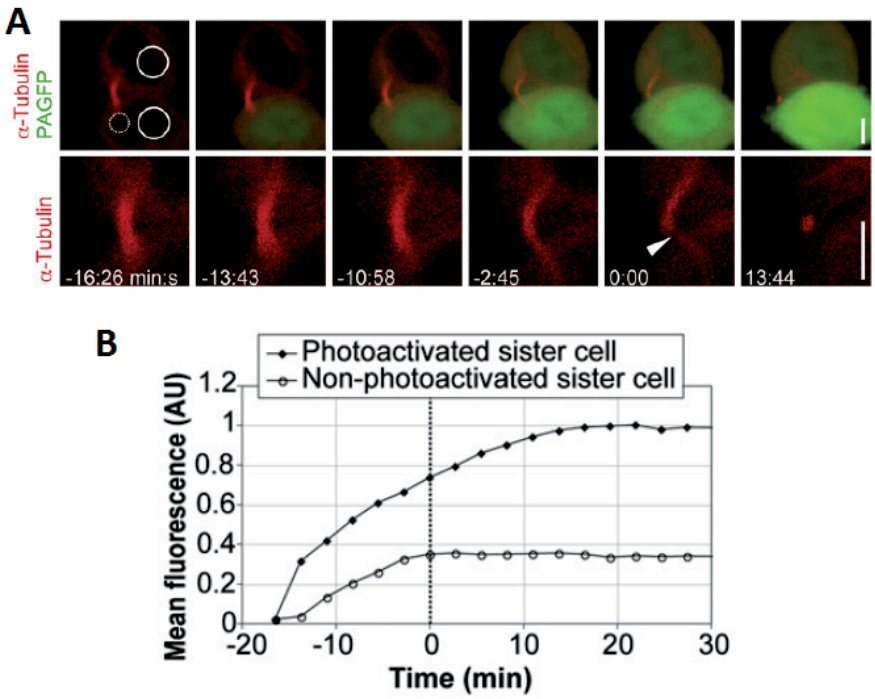


Figure 52 : Méthode de détermination de l'abscission par utilisation de la PA-GFP
A) Photo-activation répétitive de la PA-GFP dans une seule des deux cellules filles (cellule du bas, petit cercle), et mesure de la fluorescence dans les deux cellules filles (grands cercles). La flèche indique le début de la coupure des microtubules du pont. Echelle 5 µm. Echelle de temps en minutes et secondes, 0 min au moment de l'abscission. B) Evolution de la fluorescence de la PA-GFP dans les deux cellules, en cercles pleins pour la cellule photo-activée, et en cercles vides pour la cellule non photo-activée. L'abscission est déterminée lorsque la fluorescence de la cellule non photo-activée n'augmente plus (ligne en pointillés). D'après (Steigemann et al., 2009).

En utilisant cette technique de détermination précise de l'abscission, Steigemann et collaborateurs montrent que dans les cellules HeLa Kyoto, **la coupure des microtubules, nette et de part et d'autre du midbody, est concomitante avec la fission de la membrane, événement final de l'abscission**. Ainsi, pour déterminer l'abscission dans les expériences réalisées au cours de ma thèse, j'ai utilisé le **signal de fluorescence des microtubules**, et en cas de doute, notamment dans les cas de mode B et C où les ponts sont longs donc facilement observables, l'imagerie en lumière transmise (contraste de phase ou DIC) permettait de suivre l'état de la membrane.

2. Vidéomicroscopie et cytocinèse

Nous avons vu que le suivi en fluorescence de l'état des microtubules dans le pont intercellulaire permet d'avoir une bonne estimation du moment auquel l'abscission a lieu.

Afin d'étudier la régulation dans le temps de l'abscission, une approche en vidéomicroscopie permettant de suivre tous les événements de la division cellulaire a été développée au cours de ma thèse. Plusieurs ajustements ont été nécessaires afin d'obtenir une méthode robuste de vidéomicroscopie en fluorescence compatible avec l'étude de la division cellulaire dans son ensemble :

- Utilisation d'une **lignée stable** exprimant des marqueurs fluorescents de l'**ADN** et des **microtubules** : lignée cellulaire HeLa Kyoto Histone2B-mCherry et α-tubuline-EGFP provenant du laboratoire de Daniel Gerlich. Elle permet de suivre toutes les étapes de la division cellulaire, en particulier l'évolution des microtubules du pont au cours de la cytocinèse, et de déterminer aisément l'abscission (Figure 53). Le **temps d'abscission** est alors défini par le temps écoulé entre l'anaphase et l'abscission. Cette lignée permet également de vérifier la qualité de la ségrégation de l'ADN afin d'éliminer les cellules présentant un pont d'ADN au sein du pont intercellulaire, phénomène connu pour retarder l'abscission. D'autres lignées stables ont été construites, comme une lignée HeLa Kyoto α-tubuline-mCherry et une lignée HeLa non-Kyoto Histone2B-mCherry et α-tubuline-EGFP.

- Utilisation d'un **objectif à faible grossissement (20x)** mais permettant une **bonne résolution (0,75 d'ouverture numérique notée NA)**. Ce type d'objectif permet d'avoir un nombre important de cellules par champ de vision (faible grossissement) et ainsi d'améliorer les statistiques par expérience, tout en assurant une observation fine des microtubules du pont (1 µm de diamètre) et de leur coupure lors de l'abscission. De plus, un objectif à faible grossissement offre une profondeur de champ suffisamment importante pour ne pas avoir besoin d'acquérir plusieurs images en Z pour suivre le pont intercellulaire qui change de position au cours du réétalement des cellules filles : environ à 10 µm au-dessus du substrat en début de cytocinèse, puis à 1 ou 2 µm du substrat lors de l'abscission quand les cellules sont complètement réétalées. La qualité de l'optique du microscope est également essentielle afin d'éviter une sur-illumination des cellules.

- Utilisation de boîte de pétri pour culture cellulaire à **fond de verre** pour permettre une fluorescence optimale et une épaisseur suffisamment petite pour que l'objectif 20x 0,75 NA soit utilisable (distance de travail de 1 mm).

- Utilisation d'un milieu de culture **sans rouge de phénol** pour éviter une auto-fluorescence du milieu de culture qui, à faible grossissement donc grande profondeur de champ, introduit un bruit de fond important.

- Enregistrement de **films longs** (entre 20h et 24h) de cellules non synchronisées afin de limiter les défauts de ségrégation de l'ADN (par exemple suite à une synchronisation à la Thymidine) affectant l'abscission.

- Utilisation d'un **autofocus robuste**, basé sur la reconnaissance des interfaces air/verre et verre/milieu de culture au moyen d'un laser infrarouge, et non d'un autofocus basé sur la reconnaissance d'images (« image-based autofocus ») qui est très lent, très toxique si utilisé sur un canal de fluorescence, et peu robuste si utilisé sur la lumière transmise. En effet, le pont intercellulaire ne faisant que 1 à 2 µm de diamètre, un décalage de quelques microns en Z suffit à perdre l'image des microtubules du pont.

Grâce à cette méthode de vidéomicroscopie, il a été possible de filmer les cellules sur des durées allant de quelques heures à plusieurs jours, et de suivre toutes les étapes de la division cellulaire, en particulier l'abscission à la fin de la cytocinèse (Film 1).

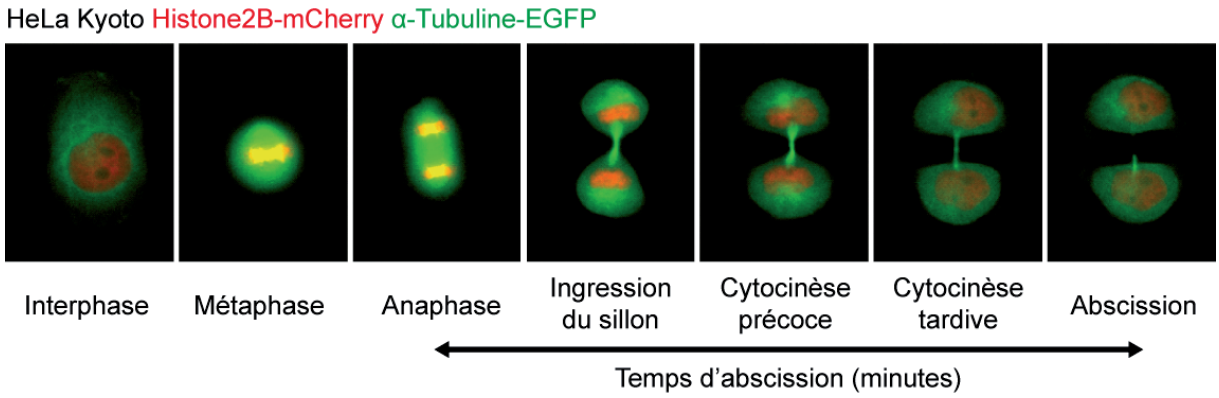


Figure 53 : Etude de la division cellulaire en vidéomicroscopie
Images en vidéomicroscopie à épifluorescence, objectif 20x et ouverture numérique 0,75. Les cellules sont cultivées sur des micro-motifs adhésifs permettant de stabiliser la position des cellules filles (voir chapitre suivant). Cellules provenant du laboratoire de Daniel Gerlich.

Un autre point important pour la vidéomicroscopie est la toxicité de l'illumination sur les cellules, ou **photo-toxicité**. En effet, les cellules en division sont particulièrement sensibles au stress induit par l'illumination : sous un vidéomicroscope, des cellules souffrant légèrement à cause de l'illumination peuvent très bien ne pas mourir mais ne pas se diviser. En métaphase, les cellules sont encore plus sensibles, et une illumination trop importante peut facilement bloquer la cellule en métaphase, qui ne passe alors jamais en cytocinèse… Cette sensibilité à l'illumination est encore plus contraignante lors de vidéomicroscopies à haute résolution, nécessitant parfois une acquisition en Z, ou l'acquisition de nombreux canaux de fluorescence (comme lors des expériences de « Traction Force Microscopy » décrites plus loin). Il convient donc, pour tous les types de vidéomicroscopie utilisés, d'adapter au mieux les conditions d'illumination, en **diminuant au maximum l'intensité de l'illumination** (juste assez pour que le signal soit quantifiable mais pas pour que l'image soit particulièrement « belle »), **diminuer au maximum le nombre d'images prises** (moins de plans en Z), et **ne pas imager en fluorescence lorsque cela n'est pas nécessaire** (la fluorescence de l'ADN n'est pas forcément nécessaire à tous les points de temps pour

vérifier la présence de ponts d'ADN). Ces mises au point ont été particulièrement importantes pour suivre la dynamique de CHMP4B-GFP (ESCRT-III) au cours de la cytocinèse. Exprimé à un niveau endogène pour éviter l'effet dominant négatif d'une surexpression, CHMP4B-GFP a un signal de fluorescence très faible, et les objets à imager sont très petits (de l'ordre du micron). L'étude de la lignée HeLa Kyoto CHMP4B-GFP α-tubuline-RFP a nécessité l'acquisition de films à haute résolution réunissant toutes les conditions pour préserver les cellules filles de toute photo-toxicité : utilisation d'un vidéomicroscope confocal à spinning disk (moins de bruit de fond que l'épifluorescence, meilleure précision) équipé d'une caméra amplifiée (EM-CCD) permettant de diminuer l'illumination des cellules, et un objectif 100x à huile 1,4 NA en parfait état. L'acquisition en multi-positions est lancée sur des cellules choisies pour être sur le point de se diviser (métaphase) uniquement en lumière transmise pour ne pas perturber le passage en anaphase et le déroulement du début de la cytocinèse. Environ 45 min après le début de ce film en lumière transmise, l'enregistrement dun second film en fluorescence (2 canaux et Z-stacks) est lancé lorsque les ponts commencent à être suffisamment bien formés mais avant que CHMP4B ne soit recruté au midbody (état jugé par le niveau de réétalement des cellules filles). Ainsi, il a été possible de suivre la dynamique de recrutement de CHM4B au midbody et la formation de la structure finale conique lors de l'abscission, à haute résolution, dans des cellules en bonne santé (Figure 4 et Movie S10 de l'article).

II. Etude de la cytocinèse au moyen de micro-motifs adhésifs

1. La technique des micro-motifs adhésifs

La technique des micro-motifs adhésifs est largement utilisée au laboratoire. Elle consiste en un traitement de surface permettant la microfabrication de **zones adhésives de l'échelle du micromètre (le motif) au sein d'une surface non-adhésive**, la taille et la forme du motif étant parfaitement contrôlables. Ainsi, des cellules cultivées sur ces substrats n'adhèrent qu'au niveau des motifs adhésifs, adoptant la taille et la forme du motif. Les cellules sont également capables de recouvrir des zones non-adhésives au sein du motif en formant des fibres de stress au-dessus de la zone non-adhésive et en renforçant les adhésions focales au niveau des zones adhésives sous-tendant la fibre de stress. L'utilisation des micro-motifs adhésifs permet le contrôle de nombreux processus cellulaires *via* la modulation de la surface d'adhésion, de la surface d'étalement ou de la géométrie de l'adhésion : contrôle de la **polarisation intracellulaire** par positionnement du noyau, du centrosome, des fibres d'actine, de l'appareil de Golgi (Manuel Théry, Racine, et al., 2006) ; contrôle de **l'axe de division** (Manuel Théry et al., 2005) ; influence de la **direction de migration** (X. Jiang et al., 2005) ; ou encore modulation de la **contractilité cellulaire** et par conséquence de la **différenciation cellulaire** (McBeath et al., 2004). De plus, l'utilisation de micro-motifs

adhésifs permet une normalisation des cellules cultivées *in vitro* et offre ainsi la possibilité de comparer des cellules dont les paramètres de surface d'adhésion et d'étalement, de contractilité et de géométrie sont bien contrôlés.

Plusieurs techniques permettent la fabrication de micro-motifs adhésifs sur une surface de verre ou de plastique (Manuel Théry, 2010). Le laboratoire a développé une technique robuste de **microfabrication des motifs sur lamelle de verre** (Figure 54). Le verre est traité à la poly-lysine-PEG (anti-adhésif cellulaire), puis illuminé aux ultraviolets profonds à travers un masque optique comportant les micro-motifs transparents. Un traitement à la fibronectine permet ensuite de rendre les surfaces illuminées (motifs) adhérentes pour les cellules (Azioune et al., 2009). Le protocole détaillé de la fabrication des micro-motifs par cette technique est présenté en Annexe du mémoire.

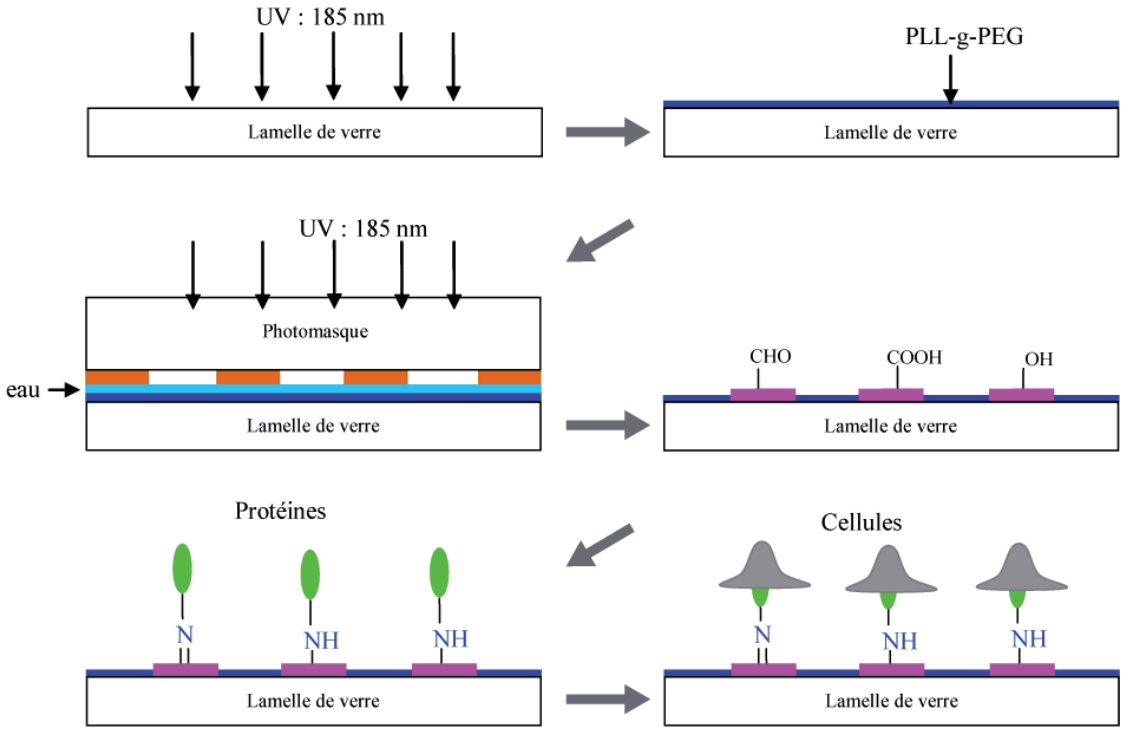


Figure 54 : Méthode de fabrication des micro-motifs adhésifs par illumination aux UV
Après activation du verre, un traitement à la poly-lysine-PEG (notée PLL-g-PEG) permet de rendre l'ensemble de la surface répulsive pour les cellules. La surface est ensuite illuminée aux UV profonds (185 nm) à travers un masque optique de chrome avant d'être incubée avec de la fibronectine. Ainsi, l'attachement cellulaire a lieu uniquement au niveau des surfaces illuminées (motifs). Figures d'Ammar Azioune.

2. Stabilisation du pont intercellulaire

Un des premiers objectifs de mon projet de thèse était d'utiliser la technique des micro-motifs adhésifs dans le but de **faciliter l'étude de la cytocinèse**, en particulier en standardisant la **position des cellules filles** et en facilitant **l'observation du pont**

intercellulaire et de sa coupure. En effet, une des difficultés de l'étude de la cytocinèse et de l'abscission réside dans la difficulté de l'observation du pont intercellulaire résultant de l'hétérogénéité des comportements des cellules filles cultivées en 2D *in vitro* : motilité des cellules plus ou moins importante, direction de migration aléatoire, pont intercellulaire de longueur variable, parfois caché si les cellules filles sont trop proches, ou parfois même cassé par une tierce cellule venant migrer entre les deux cellules filles. Ainsi, l'utilisation de micro-motifs adhésifs permettant de stabiliser la position des cellules filles, de contrôler la distance entre les cellules et la longueur du pont, ou même de stabiliser la position du pont à un endroit précis, pourrait non seulement faciliter l'observation et donc l'étude de la cytocinèse dans son ensemble, mais aussi permettre la réalisation d'études quantitatives en modulant spécifiquement certains paramètres cellulaires. De plus, la standardisation de la position des cellules permettrait le développement d'une analyse automatisée, ouvrant la porte à des études à moyenne et à grande échelle.

Dans ce but, une série de micro-motifs de formes et de tailles différentes a été testée afin d'optimiser la stabilisation des cellules filles et l'observation du pont intercellulaire. Des **motifs comportant deux parties**, une pour chaque cellule fille, ont été conçus dans le but de forcer les cellules filles à se positionner chacune à un endroit bien séparé après la division. Sur des cellules en interphase, un micro-motif en forme d'arbalète permet une bonne stabilisation de la cellule et permet également de polariser la cellule, avec la formation d'un pseudo front de migration au niveau de l'arc de cercle. Ainsi, pour stabiliser les cellules filles chacune sur leur partie du motif et éviter un « retour en arrière », un double motif comportant deux arbalètes opposées a été conçu afin de polariser les cellules filles vers l'extérieur. De plus, ce double motif permet également de varier l'adhésion entre les motifs et donc de varier l'adhésion entre les cellules filles (Figure 55) : adhésion uniquement aux extrémités du pont (gauche), pas d'adhésion du tout entre les cellules (milieu), ou adhésion continue entre les cellules filles (droite).

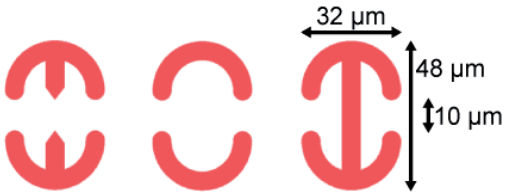


Figure 55: Double motifs pour l'étude de la cytocinèse

Lors de cette mise au point technique, la première observation a été que la **cellule mère devait s'étaler sur les deux parties du double motif avant la division** pour que les cellules filles se stabilisent correctement chacune sur leur partie de motif. Lorsque la cellule mère restait sur une seule partie, la plupart du temps les deux cellules filles restaient elles-aussi sur cette même zone du motif après la division. Eventuellement une des deux cellules pouvait rejoindre la seconde partie du motif mais de façon non contrôlée, aléatoirement

avant ou après la coupure du pont, empêchant l'observation du pont au cours de la cytocinèse (Figure 57 A). Au contraire, lorsque la cellule mère était étalée sur les deux parties du double motif, les deux cellules filles étaient systématiquement « rappelées » chacune sur leur partie, probablement grâce aux fibres de rétraction laissées par la cellule mère provenant des deux parties du motif. Ainsi, en sortie de mitose, les deux cellules filles étaient bien stabilisées chacune sur leur zone adhésive et le pont intercellulaire et l'abscission étaient clairement observables (Figure 57 C). En revanche, lorsque les deux parties du motif étaient trop proches, les cellules filles pouvaient facilement se rapprocher et même échanger leur position en tournant plusieurs fois sur le double motif, abolissant à la fois l'observation du pont et la stabilisation des cellules (Figure 57 B). Il est donc essentiel d'adapter la **distance entre les parties du motif** pour à la fois permettre l'étalement de la cellule mère (deux parties pas trop éloignées) et à la fois éviter le rapprochement des cellules filles (deux parties suffisamment éloignées). Quelle que soit la conception des motifs, il y a toujours une **balance à optimiser entre succès d'étalement de la cellule mère et stabilisation des cellules filles**.

La seconde observation a été que **le pont intercellulaire se positionnait** différemment en fonction de la forme et de la disposition des micro-motifs. Lorsque la distance entre les enveloppes convexes des deux parties du motif était partout la même, comme sur un couple de parenthèses, le pont se formait généralement au centre du motif mais pouvait se déplacer aléatoirement entre les deux cellules filles (Figure 56 gauche). En revanche, le pont intercellulaire était stabilisé à un endroit précis entre les cellules filles lorsque la distance entre les deux enveloppes possédait un minimum à un seul endroit, comme deux triangles opposés (Figure 56 droite), le pont se formant alors systématiquement à l'endroit où la distance était la plus petite.

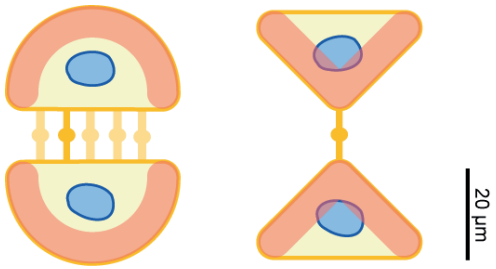


Figure 56 : Position du pont intercellulaire en fonction du micro-motif adhésif
A gauche, longueur du pont constante mais position aléatoire entre les cellules filles. A droite, position du pont contrôlée de façon reproductible.

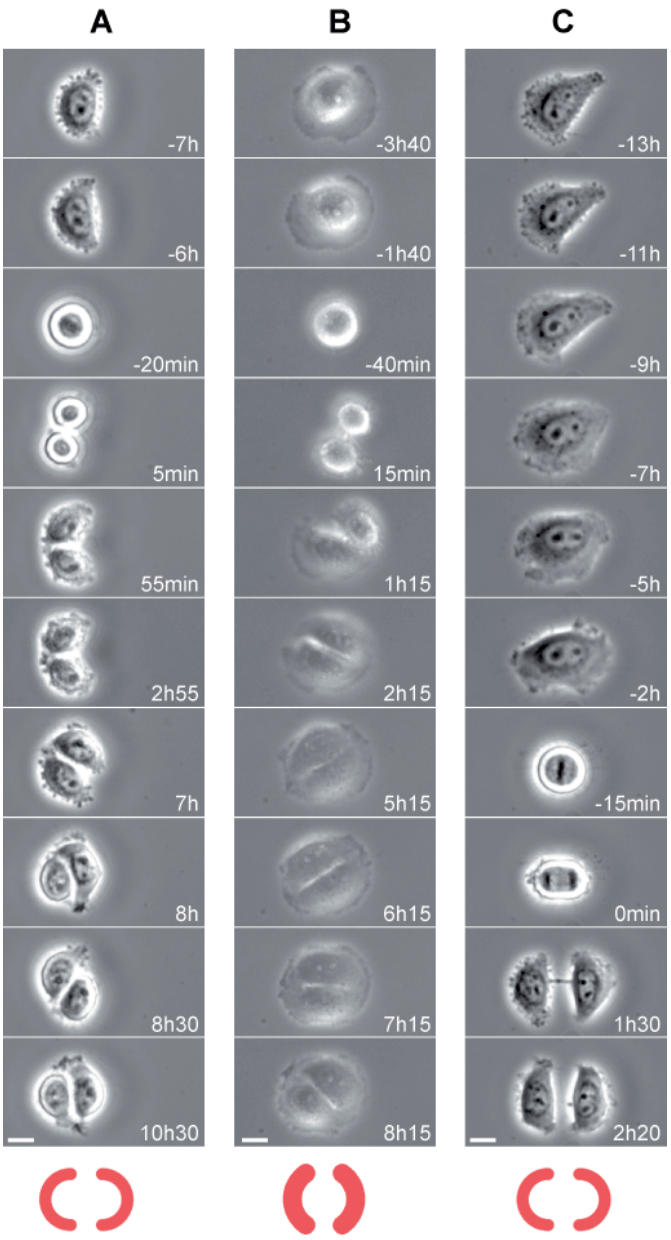


Figure 57 : Optimisation des micro-motifs adhésifs pour l'observation de la cytocinèse
Vidéomicroscopie en contraste de phase de cellules HeLa cultivées sur différents micro-motifs adhésifs (représentés en rouge en dessous des images de microscopie). Temps indiqué en heures et minutes, 0 minute correspondant à l'anaphase. Echelle 10 µm.

Finalement, ces observations ont permis d'établir certaines règles pour la conception de micro-motifs stabilisant les cellules filles et permettant l'observation claire du pont intercellulaire, lui-même positionné à un endroit précis et prédictible :

- Micro-motif comportant deux parties distinctes
- Micro-motif permettant l'étalement de la cellule mère sur l'ensemble du motif : distance entre les deux parties du motif et surface totale d'étalement suffisamment petites pour être couvertes par la cellule mère

- Distance entre les deux parties du motif suffisamment importante pour éviter un rapprochement des deux cellules filles
- Distance entre les enveloppes convexes des deux parties du motif comportant un minimum unique afin de positionner le pont à cet endroit
- Dimensionnement à adapter à chaque type cellulaire en fonction de la taille des cellules et de leur comportement post-mitotique (motiles ou non). Les dimensions données en Figure 55 et en Annexe sont adaptées aux cellules HeLa.

Un intérêt majeur de la stabilisation des cellules filles et du pont intercellulaire (Figure 58 A) est la possibilité d'analyser les films de vidéomicroscopie (Film 5) au moyen de **kymographes** qui permettent de condenser l'information temporelle en une seule image. En effet, il suffit de tracer une seule ligne passant par le centre du double motif pour construire le kymographe et d'observer ensuite sur une seule image les différents événements du film (Figure 58 B) : étalement de la cellule mère, division, réétalement des cellules filles, formation et maintien du pont intercellulaire entre les deux cellules filles, puis abscission (moment à partir duquel le pont n'est plus présent entre les cellules). Il est également possible de **quantifier divers paramètres** à partir de ces kymographes : longueur du pont, distance entre les cellules filles, temps d'abscission, évolution de la fluorescence de la tubuline-GFP du pont et donc définition du mode de coupure, etc. Ces étapes d'analyse pourraient même être **automatisées** en détectant automatiquement la forme du motif grâce à l'utilisation de fibronectine fluorescente, en définissant ensuite la ligne servant à construire le kymographe à partir de la forme du motif prédisant la position des cellules filles et du pont intercellulaire, puis en analysant les différents paramètres à partir du kymographe.

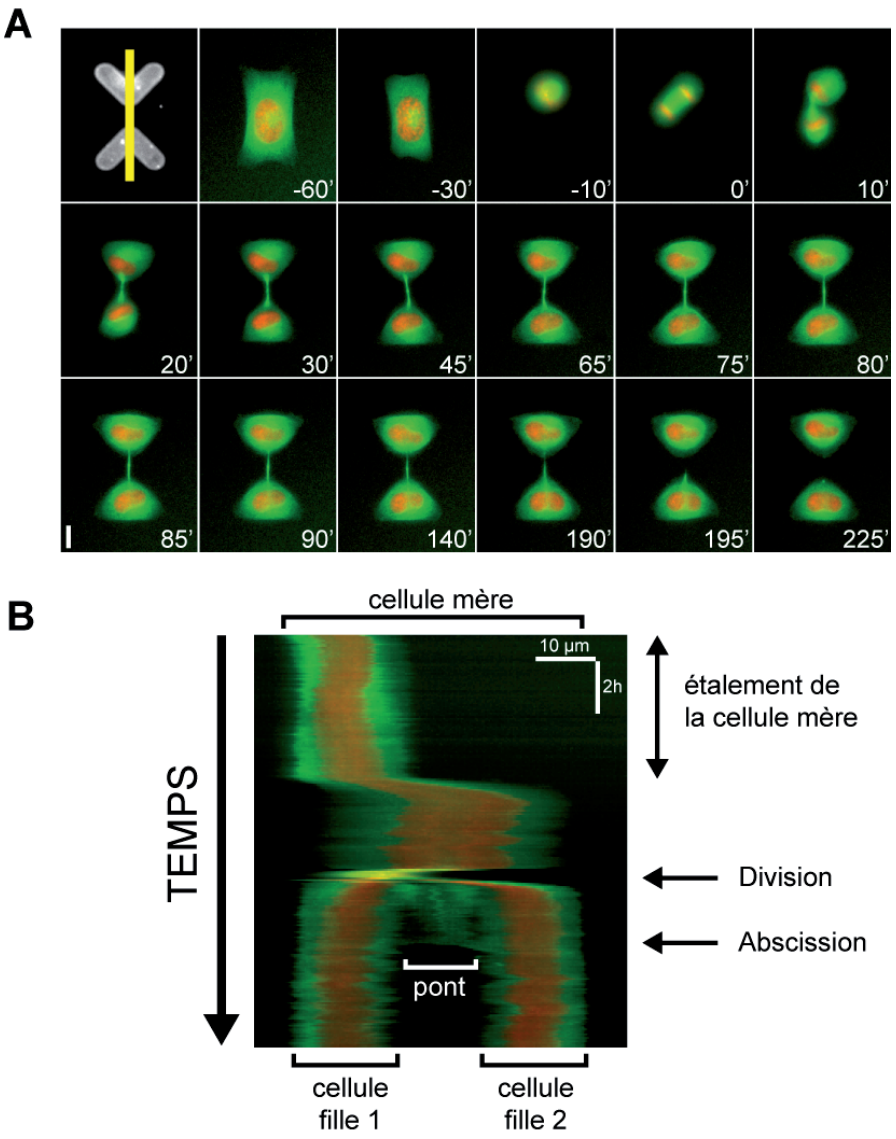


Figure 58 : Représentations sous forme de planche et de kymographe des films de vidéomicroscopie
Suivi de la cytocinèse et de l'abscission en vidéomicroscopie, cellules HeLa Kyoto Histone2B-mCherry (rouge) et α-Tubuline-EGFP (vert). A) Représentation sous forme de planche, temps indiqué en minutes, 0 minute correspondant à l'anaphase. La première image représente le micro-motif adhésif utilisé (fibronectine fluorescente). La ligne jaune indique la région utilisée pour établir le kymographe ci-dessous. Echelle 10 µm. B) Représentation sous forme de kymographe du film présenté ci-dessus. Echelles : 10 µm (horizontal) et 2 heures (vertical).

3. Contrôle de différents paramètres cellulaires au cours de la cytocinèse

L'utilisation de micro-motifs adhésifs permet de contrôler de nombreux paramètres intra et extra cellulaires. Il est alors possible d'étudier le déroulement de la cytocinèse et de l'abscission en fonction de ces paramètres cellulaires. Dans ce but, et selon les principes présentés dans le paragraphe précédent, j'ai conçu une **série de micro-motifs** permettant de **contrôler différents paramètres au cours de la cytocinèse**, présentés dans la Figure 59. Les plans détaillés des masques optiques sont également présentés en Annexe.

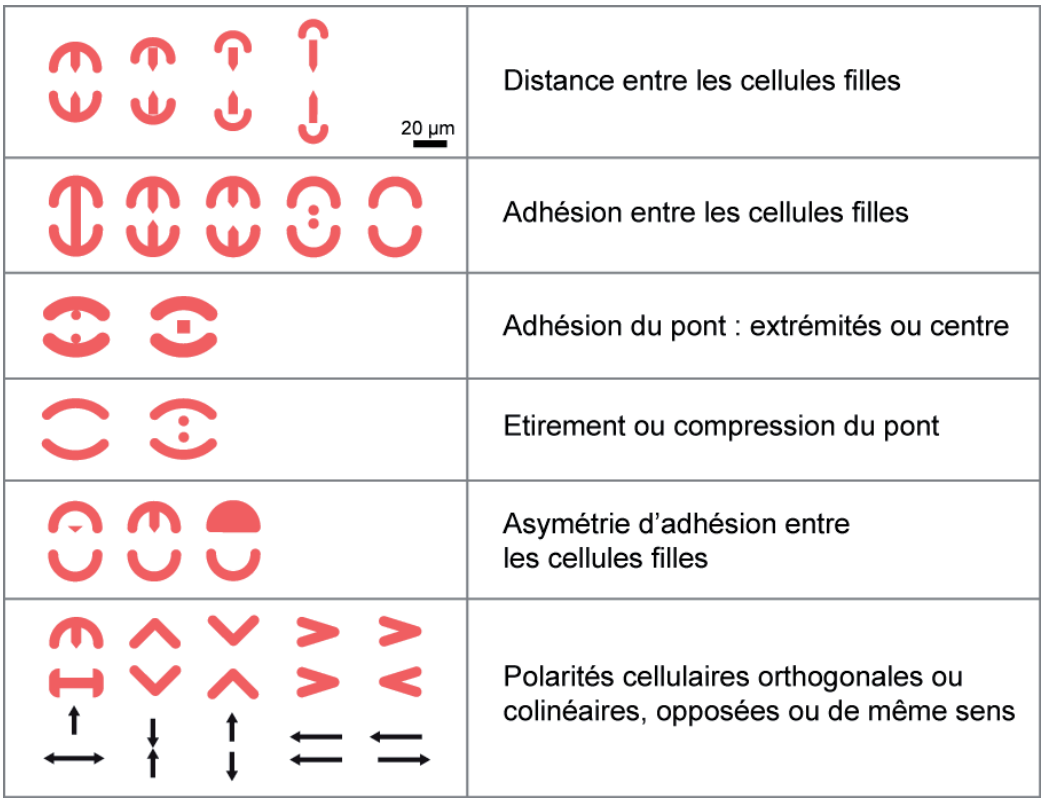


Figure 59 : Paramètres cellulaires contrôlés grâce aux micro-motifs adhésifs

Cette technique ouvre donc un champ très large d'investigations. Au début de ma thèse, j'ai adapté la technique des micro-motifs adhésifs à l'étude de la cytocinèse (stabilisation des cellules filles, stabilisation du pont, conception de motifs contrôlant divers paramètres cellulaires). Ensuite, il a fallu comprendre et caractériser les grands principes de base de la régulation de l'abscission par l'environnement des cellules filles avant de pouvoir envisager des études à haut débit utilisant une série de micro-motifs ou une collection de siRNA. Il serait très intéressant, maintenant que le système est mieux compris, de revenir vers ce genre d'outils pour étendre la compréhension de la régulation de l'abscission.

III. Micromanipulation

Pour étudier le rôle de l'environnement des cellules filles sur la régulation dans le temps de l'abscission, la première approche, décrite plus haut, a été de contrôler l'environnement 2D des cellules au moyen des micro-motifs adhésifs. La seconde approche a été de perturber cet environnement au moyen de micromanipulations dans le but d'augmenter ou de diminuer la tension entre les cellules filles, et d'étudier si ces perturbations pouvaient retarder ou induire l'abscission.

1. Système d'étirement cellulaire

La première technique de micromanipulation a été d'utiliser un système permettant un **étirement cellulaire uni-axial**. Ce système consiste en un substrat de culture étirable (fine membrane de silicone polydiméthylsiloxane, communément appelé **PDMS**) maintenu d'un côté par un montant fixe et de l'autre par un montant mobile au moyen d'une vis micrométrique. Cette membrane, en suspension entre ces deux montants, peut alors être étirée, provoquant l'étirement des cellules (Figure 60). De plus, des **micro-motifs adhésifs** peuvent être produits sur cette membrane de PDMS en utilisant la technique d'illumination aux UV décrite plus haut. Ainsi, il est possible d'obtenir des **cellules filles stabilisées sur des micro-motifs avec l'axe du pont intercellulaire parallèle à l'axe d'étirement du système**.

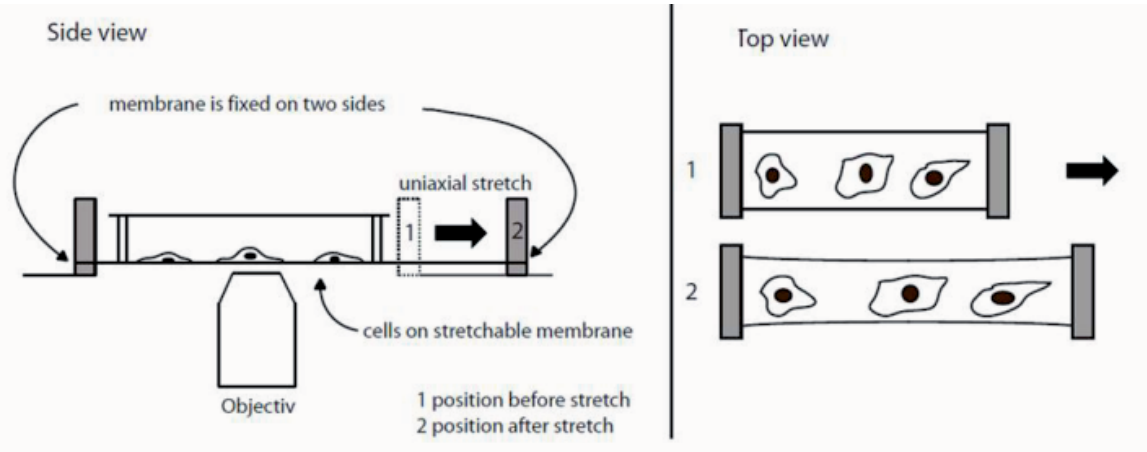


Figure 60 : Principe du système d'étirement cellulaire
A gauche, vue de profil, à droite vue de haut. La membrane de PDMS est étirée selon un seul axe, provoquant l'étirement des cellules. D'après (Yoshigi et al., 2005).

Les premières expériences réalisées consistaient en l'**étirement** des cellules filles dans le but d'**augmenter la tension dans le pont intercellulaire** et d'observer si l'abscission était retardée. La principale limitation de cette expérience a été que les cellules se ré-adaptaient rapidement à leur nouveau substrat et se ré-organisaient d'une façon qui pouvait relâcher la tension dans le pont, indépendamment de l'étirement du substrat. Une méthode d'étirement cyclique (succession d'étirement et de relâche) a également été testée afin d'améliorer l'effet de la mise sous tension du pont intercellulaire (Film 7). Finalement, cette approche d'étirement s'est avérée mal adaptée à la problématique de l'étude de l'abscission pour deux raisons : i) la difficulté à maintenir une tension entre les cellules filles sur une durée de plusieurs heures à cause de l'adaptabilité des cellules, et ii) la difficulté à interpréter un résultat de retard d'abscission, le retard pouvant provenir d'un stress cellulaire dû aux étirements répétés, ou tout autre mécanisme indirect qui aurait comme conséquence de retarder l'abscission.

Par la suite, l'approche inverse a été utilisée : **diminuer artificiellement la tension dans le pont** et observer si la relâche de tension est suffisante pour induire l'abscission ; dans ce cas, il serait peu probable que l'induction de l'abscission provienne d'un effet indirect. En utilisant le même système d'étirement, il est également possible de **comprimer les cellules filles** simplement en commençant l'expérience par l'état étiré (culture sur substrat étiré) puis en **relâchant le substrat** pour rapprocher les cellules filles (Figure 61). Outre la difficulté de mise en œuvre du système, cette approche comportait plusieurs limitations qui ont empêché l'obtention de résultats clairs :

- étirement maximal de la membrane de 30%, ce qui permet une compression des cellules limitée. Cette limitation du système a deux conséquences : i) lors de la relâche du substrat, les cellules filles sont certes rapprochées, mais le pont n'est pas réellement compressé et reste bien droit au lieu de se courber ; ii) si la relâche de tension n'est pas totale (juste une diminution de la tension) et qu'elle n'induit pas l'abscission, il est alors difficile d'interpréter le résultat de l'expérience.

- comme dans le cas de l'étirement, les cellules se ré-adaptent vite à l'état de leur substrat (en une dizaine de minutes) et peuvent se repositionner de telle sorte que le pont redevienne sous tension.

- impossibilité d'utiliser le système en multi-position (suivi aux oculaires de la position lors de la relâche du substrat), donc caractère très chronophage de l'expérience.

- de nombreuses adaptations à prévoir pour utiliser le système en microscopie à haute résolution, par exemple pour pouvoir observer les ESCRT-III. Dans sa configuration actuelle, la membrane étirable est en suspension au-dessus de l'objectif, donc très peu stable et incompatible avec des objectifs à immersion à huile.

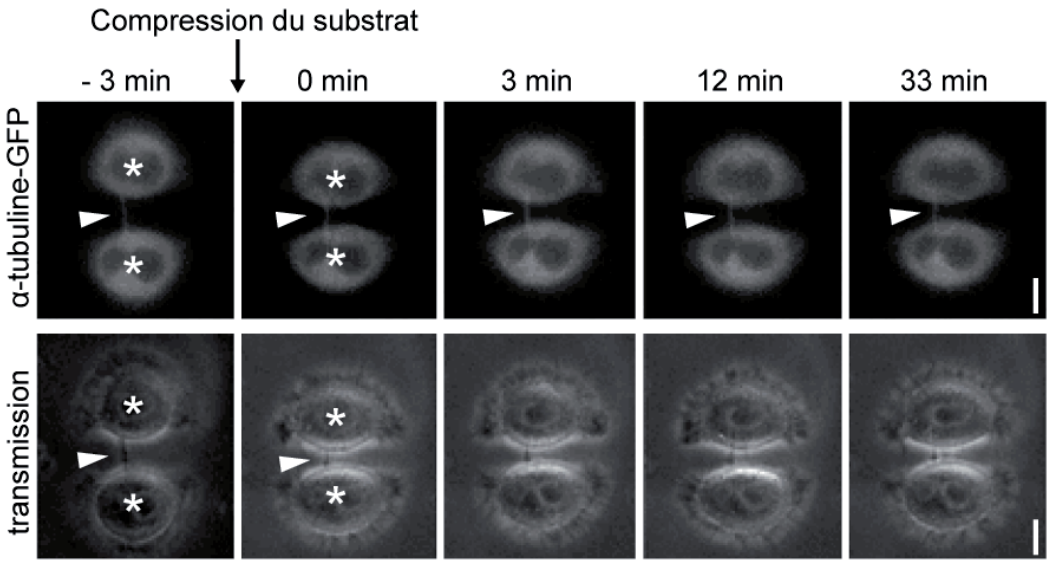


Figure 61 : Expérience préliminaire de compression du pont en utilisant un substrat étirable
Cellules étalées sur des micro-motifs adhésifs en forme de double parenthèse produits sur une fine membrane de PDMS étirable. Les astérisques indiquent la position des noyaux des cellules filles avant et après la relâche de l'étirement (notée « Compression du substrat »). Les flèches indiquent le pont intercellulaire : on remarque qu'il reste bien droit même après compression du substrat. Echelle 10 µm.

2. Micro-ablation par laser

Au vu des difficultés rencontrées avec le système d'étirement cellulaire, une autre approche a été mise au point afin de relâcher artificiellement la tension dans le pont intercellulaire. De façon naturelle, le pont est coupé successivement d'un côté puis de l'autre côté du midbody. Ces deux coupures mettent en jeu les mêmes mécanismes moléculaires, la seconde coupure ayant lieu rapidement après la première (15 minutes en moyenne, alors que le temps d'abscission total est de l'ordre de 1h30). Ainsi, la méthode pour relâcher la tension dans le pont a été de **couper artificiellement le pont d'un côté du midbody** exactement comme l'aurait fait une des deux cellules filles lors de l'abscission, et d'observer ensuite si la coupure de l'autre côté du pont est induite par cette relâche artificielle de tension. La façon la moins invasive de couper le pont a été d'utiliser un système d'ablation au moyen d'un laser puissant, contrairement à l'utilisation d'une micro-fibre ou micro-pipette par exemple qui casserait le pont. Cette expérience d'ablation est d'autant plus facilitée que, de par sa nature, le pont intercellulaire se situe en dehors des cellules, l'ablation du pont ne perturbant donc pas l'homéostasie des cellules. La mise au point des conditions d'ablation (puissance du laser, temps d'exposition du laser, zone à couper) a permis l'établissement d'une méthode de coupure artificielle propre d'un côté du pont qui ne perturbe pas l'organisation des microtubules du midbody. Un système d'ablation basé sur un laser UV permet l'ablation complète du pont (microtubules et membrane, Movie S7 de l'article), alors qu'un système basé sur un laser 2-photon offre une résolution suffisante pour couper les

microtubules du pont sans couper la membrane plasmique (Film 8). Ces expériences sont décrites en détail dans l'article (ablation UV) et dans la discussion (ablation 2-photon).

3. Système de double pipette

Finalement, un système de double pipette serait idéal pour manipuler à volonté les cellules filles au cours de la cytocinèse. La Figure 62 présente un système de ce type adapté à la mesure de la force d'adhésion de deux cellules adhérentes par des jonctions cellule-cellule spécifiques des cadhérines (Chu et al., 2004) : **chacune des deux cellules du doublet est tenue par une pipette au moyen d'une aspiration contrôlée et il est possible de les rapprocher ou de les éloigner sans limite de distance**. Un autre intérêt de ce système est le contrôle de la tension de membrane *via* l'aspiration des pipettes indépendamment de la distance entre les cellules. Couplé à un système d'imagerie permettant une résolution suffisante pour visualiser en fluorescence les microtubules, ou encore mieux les ESCRT-III, ce système permettrait donc de micro-manipuler précisément les cellules filles et d'étudier la régulation de l'abscission en fonction des paramètres physiques des cellules filles.

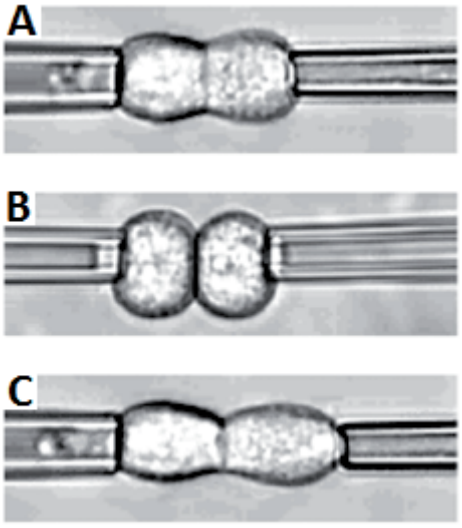


Figure 62 : Système de double pipette
Mis au point pour la mesure de la force d'adhésion entre deux cellules, ce système permet de maintenir un doublet de cellules (A) et de moduler la distance entre les deux cellules à volonté : (B) rapprochement, (C) éloignement. Il pourrait être adapté à l'étude de la cytocinèse en remplaçant le doublet de cellules adhérentes par un doublet de cellules filles issues d'une division. Adapté de (Chu et al., 2004).

IV. Mesures de forces au cours de la division cellulaire

1. Microscopie à force atomique

La technique de microscopie à force atomique, ou « Atomic Force Microscopy » en anglais (AFM), permet l'étude des propriétés topologiques et physico-chimiques d'une surface. Son principe repose sur l'utilisation d'une pointe très effilée positionnée à l'extrémité d'un micro-levier flexible. La détection de la déflection d'un laser réfléchi sur ce levier permet de mesurer à très haute résolution la déformation du levier (Figure 63 A). Cette technique peut être facilement utilisée sur des cellules vivantes ou des tissus biologiques pour obtenir un **profil topologique** (en mode balayage), pour **appliquer des forces** contrôlées à l'échantillon, ou encore **mesurer ses propriétés mécaniques, en particulier sa rigidité** (Figure 63 B). Pour une revue sur l'utilisation de la microscopie à force atomique en biologie, voir (Ludwig et al., 2008).

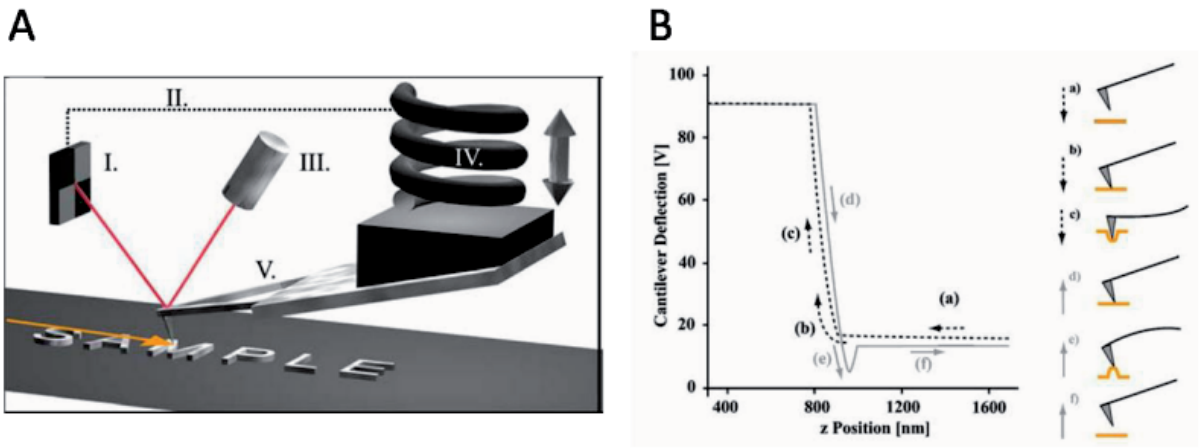


Figure 63 : Microscopie à force atomique et mesure de rigidité de l'échantillon
A) Schéma du principe de la microscopie à force atomique. La pointe fine (V), montée sur un levier flexible (IV) dont la position en Z est contrôlée par un piezo électrique, balaye point par point la surface de l'échantillon. La déformation du levier est mesurée par la réflexion d'un laser (III) sur la pointe détecté grâce à une photodiode (I). B) Mesure de la rigidité de l'échantillon. La pointe est approchée de l'échantillon (a), mise au contact (b), puis abaissée pour exercer une force sur l'échantillon, provoquant la déformation du levier. La pointe est ensuite retirée (d), l'interaction aspécifique entre la pointe et l'échantillon peut courber légèrement le levier, qui finalement est complètement détaché de l'échantillon (f). L'analyse de la déflection du levier en fonction de la position en Z de la pointe permet de calculer le module d'élasticité de l'échantillon. D'après (Ludwig et al., 2008).

Lors d'un projet mené au Marine Biological Laboratory de Woods Hole (Massachussetts) sous la direction du chercheur américain Daniel Fletcher (University of California, Berkeley), j'ai eu l'occasion d'utiliser cette technique pour effectuer des mesures de rigidité sur des cellules filles issues d'une division (Figure 64). L'imagerie topographique a permis une bonne visualisation des deux cellules reliées par le pont. Des mesures du module d'élasticité ont ensuite été réalisées à certains endroits précis : au niveau des corps cellulaires des cellules

filles, du pont intercellulaire (de part et d'autre du midbody), et sur le midbody. Lors de cette expérience test, j'ai pu observer que les deux cellules filles avaient bien la même rigidité. Le pont intercellulaire avait une rigidité supérieure au cortex des cellules, probablement à cause des faisceaux très denses de microtubules. Enfin, le midbody apparaissait moins rigide que les bras du pont mais tout de même légèrement plus rigide que les corps cellulaires, peut-être à cause de la matrice protéique très dense à ce niveau du pont. Bien que très préliminaire, cette expérience montrait qu'il était envisageable d'utiliser la microscopie à force atomique pour sonder les propriétés mécaniques du pont intercellulaire. Néanmoins, deux limitations principales rendaient cette technique moins pertinente pour l'étude de l'abscission en fonction de la tension dans le pont intercellulaire :

- Le diamètre du pont étant très petit (1 à 2 µm) et le pont étant très proche du substrat, en général du verre, il est nécessaire de prendre d'extrêmes précautions pour s'assurer que la rigidité mesurée est bien celle du pont et qu'elle n'est aucunement affectée par celle du verre.

- La microscopie à force atomique permet des mesures de rigidité très fines, même au niveau du pont intercellulaire, mais il est difficile de relier ces mesures à la force exercée entre les deux cellules et la tension appliquée sur le pont intercellulaire.

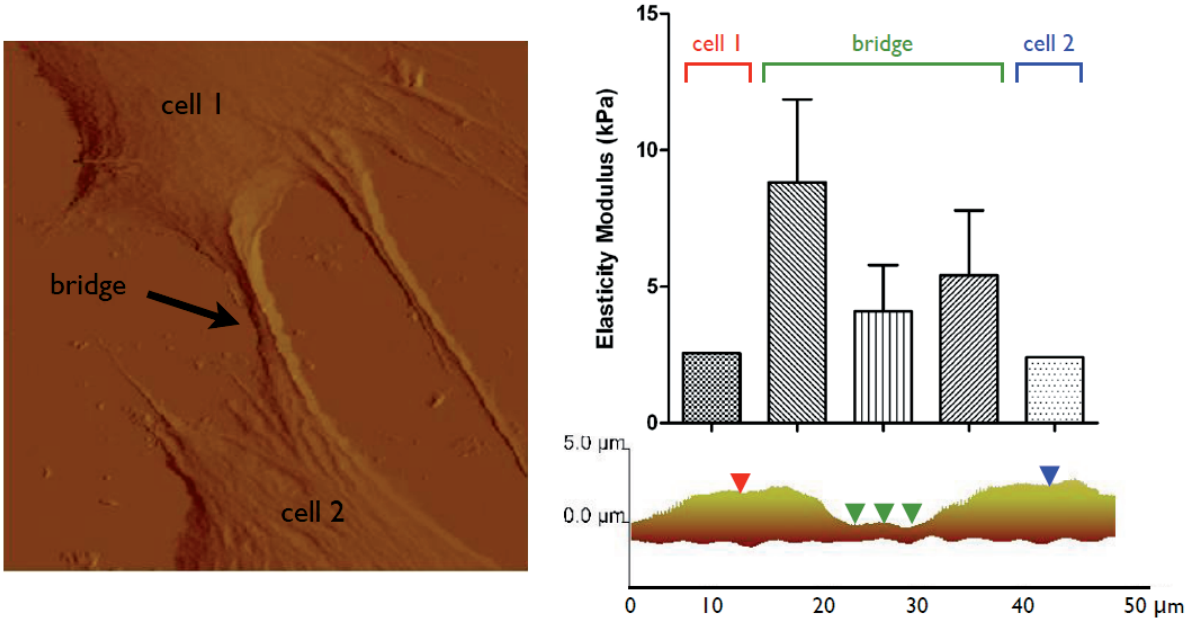


Figure 64 : Mesures de rigidité par microscopie à force atomique sur cellules en cytocinèse
A gauche, vue de dessus des cellules filles (cell 1 et cell 2) reliées par le pont intercellulaire (bridge). A droite, mesures de rigidité sur ces cellules en cytocinèse. Le graphe représente le module d'élasticité des structures testées : de gauche à droite, cellule fille 1, bras gauche du pont intercellulaire, midbody, bras droit du pont intercellulaire, cellule fille 2. En bas, vue de profil du doublet de cellules avec positionnement des points de mesure de rigidité correspondant au graphe.

2. « Traction Force Microscopy »

Par la suite, je me suis tournée vers des techniques permettant la détection et la **mesure des forces exercées par les cellules** plutôt que des mesures de rigidité des cellules ou de composants cellulaires. Une approche très utilisée pour mesurer les forces exercées par les cellules est de les cultiver sur un **substrat suffisamment souple pour qu'il soit déformé sous l'action des cellules**. Si la rigidité du substrat est connue, il est alors possible de calculer les forces exercées par les cellules pour déformer le substrat. En 1980, Harris et collaborateurs utilisent pour la première fois un substrat élastique de silicone se déformant sous l'action des forces exercées par les cellules : le substrat forme des rides lorsque les cellules sont contractées (Harris et al., 1980). Burton et Taylor adaptent ensuite cette technique pour obtenir des substrats dont les propriétés mécaniques sont bien calibrées ; ainsi ils peuvent suivre les forcent exercées par les cellules filles au cours de la cytocinèse (décrit en introduction) (Burton & Taylor, 1997). Enfin, la technique de « Traction Force Microscopy » (TFM) repose également sur l'utilisation d'un substrat déformable par les cellules (Micah Dembo & Y.-li Wang, 1999) : l'utilisation d'un **gel de polyacrylamide** permet de contrôler finement la rigidité du substrat de façon assez simple (ajustement de la proportion de polymère et de réticulant), et l'inclusion de **micro-billes fluorescentes** dans le gel permet l'observation et la quantification de la déformation du gel transparent. Ainsi, la rigidité du gel étant connue, le déplacement des billes entre un état sous contrainte (cellule tirant sur le gel) et un état au repos (gel sans cellule) permet de calculer les forces exercées par la cellule pour déformer le substrat (Figure 65).

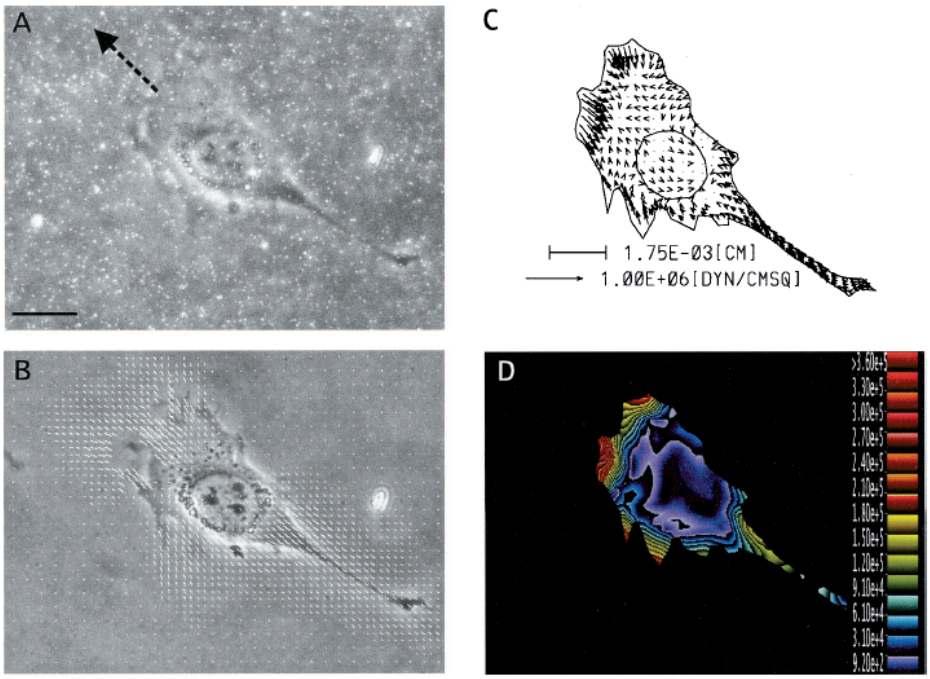


Figure 65 : Traction Force Microscopy

A) Utilisation de micro-billes fluorescentes incluses dans un gel de polyacrylamide afin de mesurer la déformation du substrat sous l'effet des forces exercées par des fibroblastes NIH 3T3. La flèche représente la direction de migration de la cellule. B) Superposition des vecteurs de déformation (flèches blanches) et de l'image de la cellule en contraste de phase. C) Champ des contraintes de traction représentées par des vecteurs (flèches noires) à l'intérieur des contours de la cellule. D) Représentation en code couleur de l'intensité des forces de traction. D'après (Munevar et al., 2001).

Cette technique possède aujourd'hui de nombreuses variantes (Figure 66) :

- **TFM à haute résolution** (Sabass et al., 2008) : amélioration de l'algorithme d'analyse pour obtenir une meilleure reconstruction du champ de forces à partir du champ de déformation du gel. Les calculs étant plus rapides, cette technique permet également d'être utilisée sur des images de vidéomicroscopie.

- **TFM en 3D** (Maskarinec et al., 2009) : suivi de la déformation du gel dans les 3 dimensions grâce à une imagerie confocale. Possibilité de calculer les forces exercées non seulement en X et Y mais aussi en Z.

- **TFM et micro-motifs adhésifs** (Tseng et al., 2011) : contrôle de la géométrie d'adhésion des cellules au substrat. Cette technique permet non seulement de standardiser la morphologie des cellules et ainsi de pouvoir comparer une cellule à une autre plus facilement (par exemple de moyenner les forces calculées sur plusieurs cellules cultivées sur le même micro-motif), mais aussi de calculer les forces uniquement à partir de la déformation du motif fluorescent (utilisation de fibronectine fluorescente), et donc de s'affranchir de l'imagerie des billes.

- **TFM sur doublet de cellules adhérentes** (Maruthamuthu et al., 2011) : déduction des forces exercées entre les deux cellules au niveau de la jonction adhérente à partir des forces exercées par chacune des deux cellules sur le substrat. En effet, lors du calcul des forces à partir de la déformation du gel, la somme des forces exercées par chacune des cellules est nulle si toutes les forces exercées par la cellule sont exercées sur le substrat. Si certaines forces sont exercées sur l'autre cellule et non sur le substrat, la somme des forces calculées à partir de la déformation du gel n'est plus nulle mais reflète un déséquilibre correspondant aux forces exercées entre les deux cellules.

Pour conclure, cette méthode de mesure des forces exercées par les cellules offre de nombreuses possibilités et est relativement simple à mettre en œuvre dans un laboratoire (gels de polyacrylamide très courants dans les laboratoires de biologie). J'ai donc utilisé la technique de TFM afin de mesurer les forces exercées par les cellules filles au cours de la division. Certaines mises au point ont été nécessaires afin d'utiliser la TFM sur des cellules en division, essentiellement au niveau des **conditions d'imagerie**. Comme discuté au début de ce chapitre, les cellules en division, et en particulier en cytocinèse, sont très sensibles à l'illumination. Afin de pouvoir suivre les forces exercées par les cellules au cours de la cytocinèse, il a fallu adapter les conditions d'imagerie pour **réduire au maximum l'exposition des cellules à la lumière fluorescente** : ajuster au mieux le nombre de plans en Z, imager la fluorescence de l'ADN uniquement à certains points de temps, et diminuer l'épaisseur des gels au maximum (environ 30 µm) pour améliorer la qualité de l'image et ainsi diminuer l'exposition à la lumière. Ainsi, il a été possible de filmer les cellules tout au long de la cytocinèse, depuis la métaphase/anaphase jusqu'à l'abscission, en enregistrant des images en contraste de phase et en fluorescence pour visualiser les microtubules, l'ADN, et les billes du gel (Movie S3 de l'article). Ensuite, l'analyse des données a été effectuée par nos collaborateurs physiciens à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, Martial Balland et Irène Wang. A partir des films des billes et des contours des cellules, ils ont pu mesurer le déplacement des billes et calculer les forces exercées par les cellules filles sur le gel (Movie S4 de l'article). Ces expériences, décrites dans l'article, ont permis de mesurer plusieurs paramètres physiques au cours de la cytocinèse. En revanche, la force exercée entre les deux cellules filles, théoriquement calculable par la même méthode que la TFM sur doublet de cellules adhérentes entre-elles, semble être très faible par rapport aux forces exercées sur le substrat, et n'est pour le moment pas accessible avec cette méthode (mesure trop bruitée). D'autres approches demandent encore à être développées pour accéder précisément à cette mesure en utilisant la TFM.

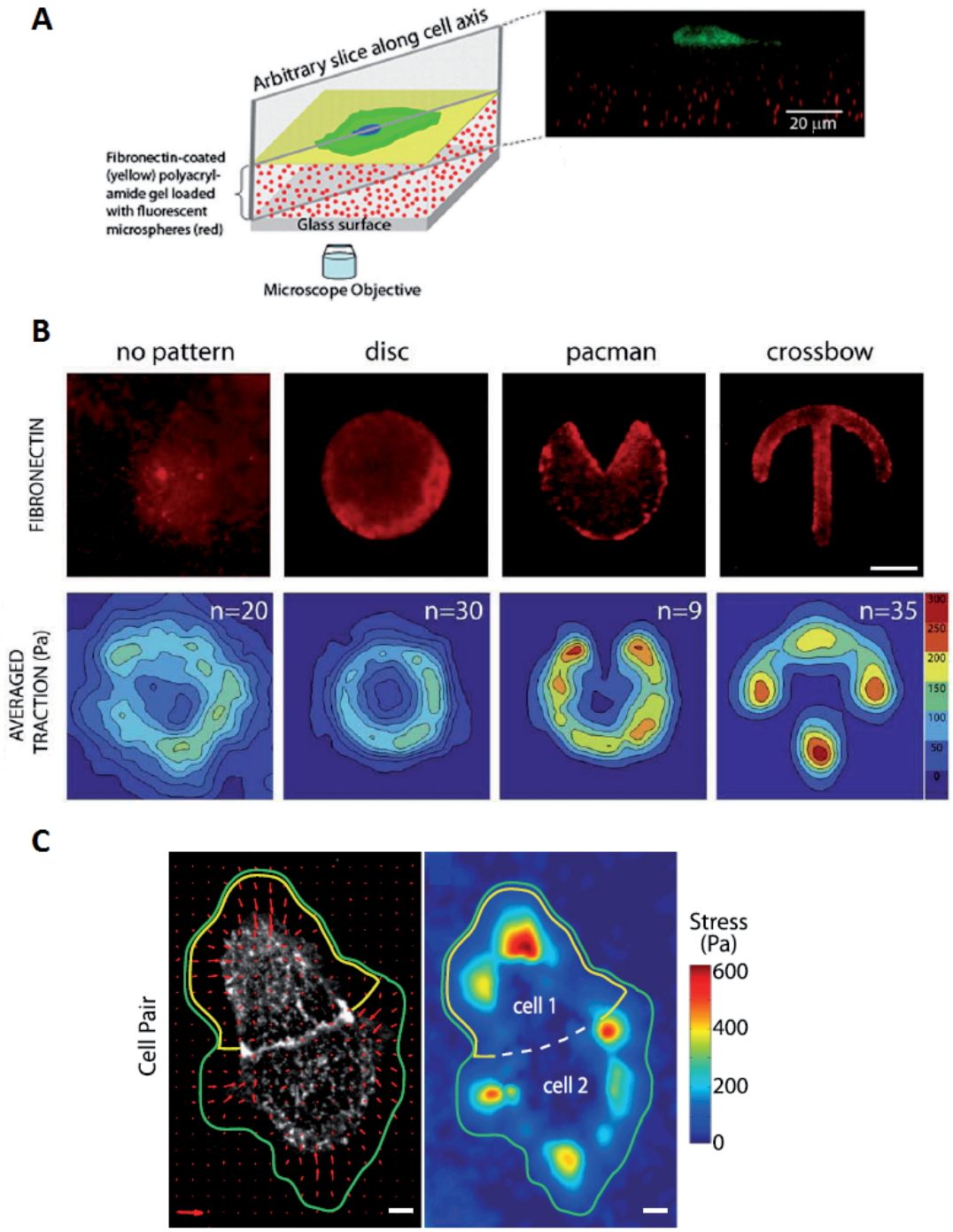


Figure 66 : Variantes de la Traction Force Microscopy (TFM)

A) TFM en 3D. Schéma de principe et imagerie confocale (vue de profil) de l'expérience : des fibroblastes transfectés à la GFP (vert) sont cultivés sur un gel de polyacrylamide traité à la fibronectine (jaune), gel comportant des micro-billes fluorescentes (rouge). Les mouvements des billes sont analysés en X et Y mais aussi en Z (verticalement). D'après (Maskarinec et al., 2009). B) TFM et micro-motifs adhésifs. En haut, visualisation de la fibronectine fluorescente utilisée pour faire les micro-motifs adhésifs sur des gels de polyacrylamide déformables (échelle 10 µm). En bas, superposition et moyenne sur plusieurs cellules (nombre précisé sur chaque image en haut à droite, n=) des forces de traction développées par les cellules MCF10A cultivées sur ces micro-motifs adhésifs. L'intensité des forces de traction est codée par la couleur. D'après (Tseng et al., 2011). C) TFM sur doublet de cellules adhérentes entre-elles. A gauche, image en fluorescence de la GFP-E-cadhérine d'un doublet de cellules MDCK. Les vecteurs des contraintes de traction sont représentés par des flèches rouges superposées à l'image de fluorescence. Les contours des deux cellules (vert) et de la cellule 1 (jaune) sont représentés par une ligne. A droite, intensité des contraintes représentée en code couleur. Echelle 5 µm (blanc) et vecteur de référence (flèche rouge) de 950 Pa. D'après (Maruthamuthu et al., 2011).

3. Utilisation de micro-piliers

Pour mesurer les forces exercées par les cellules sur leur substrat, une alternative à l'utilisation d'un gel déformable comme pour la TFM est l'utilisation d'un **substrat microfabriqué flexible** (J. L. Tan et al., 2003; Roure et al., 2005). Ce substrat de silicone transparent (PDMS) comporte de très nombreux **micro-piliers** dont les dimensions (diamètre, hauteur, espacement entre les piliers) sont contrôlables afin de moduler la rigidité des piliers. Ainsi, les cellules sont cultivées sur un tapis de micro-piliers dont les propriétés mécaniques sont bien contrôlées. Si les micro-piliers sont suffisamment flexibles, les forces de traction exercées par les cellules font fléchir les micro-piliers (Figure 67). Ces forces peuvent alors être calculées à partir du déplacement du sommet des micro-piliers selon un modèle de poutre (Figure 67 B).

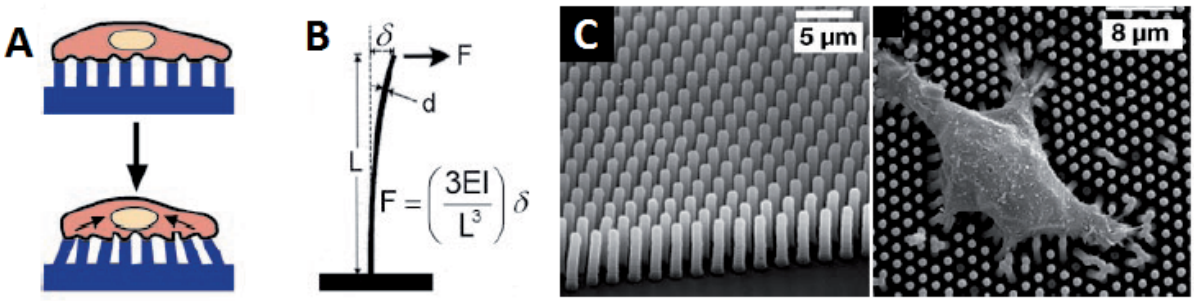


Figure 67 : Utilisation de micro-piliers pour la mesure des forces exercées par les cellules
A) Schéma de principe : une cellule contractile cultivée sur un substrat de micro-piliers exerce des forces de traction qui conduisent au fléchissement des micro-piliers. B) Modèle de poutre pour le calcul des forces exercées à partir de la flexion du micro-pilier : F la force exercée au sommet du pilier, L la hauteur du pilier, E le module d'élasticité du PDMS, I le moment d'inertie, δ le déplacement du sommet du pilier. A) et B) D'après (J. L. Tan et al., 2003). C) Images en microscopie à balayage du substrat microfabriqué comportant des micro-piliers de 1 µm de diamètre et espacés de 2 µm centre à centre. Sur la droite, la cellule fait fléchir les micro-piliers sur lesquelles elle exerce des forces de traction. D'après (Roure et al., 2005).

Au début de ma thèse, j'ai eu l'occasion de collaborer avec Benoît Ladoux, chercheur au laboratoire « Matière et Systèmes Complexes » de l'Université Paris Diderot, afin de tester cette technique pour la mesure des forces exercées par les cellules filles au cours de la cytocinèse. Des expériences préliminaires ont permis d'observer des doublets de cellules filles sur ces substrats (Figure 68 A). Les cellules étaient capables de fléchir les micro-piliers (Figure 68 B) puisque les sommets des piliers présents sous les cellules étaient déplacés par rapport au réseau d'origine (substrat sans cellules). Les cellules filles étaient également capables de faire bouger les micro-piliers sous l'action des forces qu'elles exerçaient sur le substrat (Film 11). Cependant, cette technique demandait une mise au point fastidieuse, notamment afin de trouver les dimensions des micro-piliers (diamètre et hauteur) idéales pour que le substrat soit suffisamment rigide pour que les cellules s'étalent et se divisent correctement, mais également suffisamment flexible pour que les cellules puissent le déformer. L'espacement des piliers devait également être adapté afin que les piliers ne se

touchent pas lors du fléchissement, permettant ainsi le calcul précis des forces à partir du déplacement des sommets des piliers. La Traction Force Microscopy ayant été plus rapide à mettre au point au laboratoire, elle a été utilisée en priorité pour les mesures des forces exercées par les cellules filles.

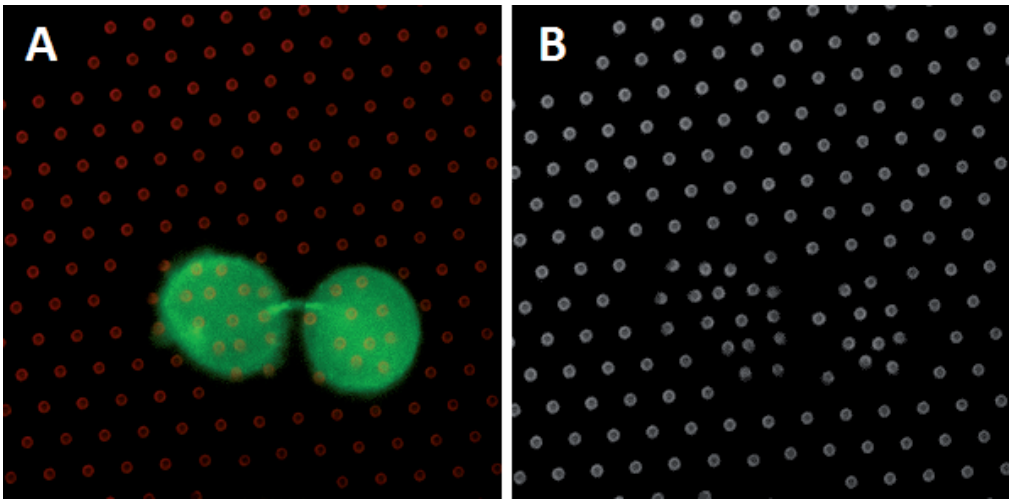


Figure 68 : Cellules filles sur substrat de micro-piliers flexibles

A) Image d'un doublet de cellules filles reliées par le pont intercellulaire. Cellules HeLa exprimant stablement la protéine de fusion EB3-GFP (vert) cultivées sur un substrat de micro-piliers de 1 µm de diamètre et de 5 µm de hauteur espacés de 3 µm centre à centre. Le sommet des micro-piliers est traité avec de la fibronectine fluorescente (rouge). B) Image des sommets des piliers uniquement : on observe le déplacement des sommets des piliers présents sous les cellules filles.

Résultats

Les résultats concernant l'étude de la régulation dans le temps de l'abscission en fonction de l'environnement des cellules filles sont présentés ici sous forme de manuscrit d'article. Une seconde partie illustre la naissance d'un projet annexe à partir d'une observation fortuite au cours des expériences d'ablation réalisées dans le cadre de l'étude de l'abscission.

I. Régulation temporelle de l'abscission par la tension dans le pont intercellulaire : induction de l'assemblage des ESCRT-III et de l'abscission par relâche de tension dans le pont

1. Résumé

La coordination dans le temps et dans l'espace des différentes étapes de la division cellulaire est essentielle afin d'assurer le déroulement correct de la division. Concernant l'abscission, la régulation dans l'espace des événements de coupure est relativement bien comprise. En effet, dans les études *in vitro* sur des cellules HeLa ou MDCK, la coupure du pont intercellulaire a lieu de façon nette de part et d'autre du midbody, structure centrale organisatrice du pont. En revanche, la régulation dans le temps est moins bien comprise, et notamment l'existence d'un signal déclencheur de l'abscission n'a pas encore été montrée. Le but de ce travail a été d'identifier des facteurs internes et externes aux cellules filles capables de retarder ou d'induire l'abscission. En particulier, **l'environnement des cellules filles**, en termes d'adhésion au substrat, de confinement spatial, ou de forces exercées par les cellules filles au cours de la cytocinèse, **joue-t-il un rôle dans le contrôle temporel de l'abscission ?**

Tout d'abord, l'utilisation de micro-motifs adhésifs de tailles différentes a permis de montrer que le confinement spatial des cellules filles régule le temps d'abscission, **des cellules moins confinées ayant une abscission retardée par rapport à des cellules plus confinées**. La vitesse de séparation des cellules filles ainsi que leur contractilité, mesurée par la méthode de Traction Force Microscopy, sont également corrélées avec le temps d'abscission, **l'abscission étant retardée lorsque les cellules se séparent plus vite ou sont plus contractiles**. Une hypothèse serait alors que les cellules filles, en se séparant rapidement après la division lorsqu'elles ne sont pas confinées spatialement, pourraient tirer sur le pont intercellulaire, exerçant ainsi une tension au niveau du pont retardant l'abscission. Selon cette hypothèse, une relâche de tension aurait alors pour effet d'accélérer l'abscission, ou même de l'induire. L'analyse quantitative du mouvement des cellules après la division a en

effet montré que **les cellules filles se rapprochent l'une de l'autre juste avant l'abscission**, relâchant potentiellement la tension exercée au niveau du pont. Dans certains cas, ce rapprochement est tel que le pont intercellulaire est courbé en forme de S, cet événement étant suivi rapidement par l'abscission. Afin de mieux **contrôler la relâche de tension dans le pont, un système d'ablation laser a été mis au point**. De façon naturelle, le pont intercellulaire est coupé d'abord d'un côté du midbody, puis de l'autre côté, avec un délai d'environ 15 minutes entre les deux coupures. Grâce à la précision du système d'ablation, il est possible de mimer la première coupure en réalisant l'ablation sur le côté du midbody, laissant ainsi un demi-pont intact. Ces expériences ont montré que **l'ablation induit la coupure du demi-pont restant** avec des délais comparables aux délais entre les deux coupures naturelles du pont dans les cellules contrôles. De plus, cette coupure induite par l'ablation est dépendante de la Spastine et de CHMP2A, protéines respectivement impliquées dans la machinerie moléculaire de l'abscission pour couper les microtubules et réaliser la fission de la membrane plasmique par les ESCRT-III. Le suivi de la dynamique de CHMP4B-GFP, composant majeur des ESCRT-III, a montré que **l'ablation induit la formation de la structure conique caractéristique des ESCRT-III lors de l'abscission**. De plus, le retard d'abscission observé sur des cellules peu confinées est corrélé à un retard de recrutement de CHMP4B au midbody et un retard de formation de la structure hélicoïdale précédant l'abscission.

Ce travail a également permis d'identifier et de caractériser **différents modes d'abscission** en se basant sur la coupure des microtubules : le **mode A** correspondant à la coupure nette de part et d'autre du midbody, décrit dans les études précédentes et impliquant la machinerie ESCRT/Spastine ; le **mode B** correspondant à un désassemblage très progressif des microtubules du pont au lieu d'une coupure nette ; et le **mode C** avec comme caractéristique principale le détachement du faisceau de microtubules des cortex cellulaires sous l'effet d'une séparation trop rapide des cellules filles. Dans les modes B et C, la machinerie ESCRT/Spastine semble complètement inhibée et l'abscission semble intervenir selon un autre processus que la coupure nette du pont. De façon intéressante, il a été observé dans une lignée plus motile une augmentation de la fréquence des modes B et C associée à un retard important de l'abscission.

En conclusion, cette étude propose une régulation temporelle de l'abscission par les forces exercées entre les deux cellules filles au niveau du pont intercellulaire : **une tension dans le pont retarde l'abscission alors qu'une relâche de la tension dans le pont induit l'abscission**. De plus, cette régulation de l'abscission par l'environnement et le comportement des cellules filles s'effectue au niveau de la dynamique des **complexes ESCRT** au pont intercellulaire : effet sur le recrutement au midbody et la formation de la structure hélicoïdale finale. Enfin, maintenir le pont intercellulaire tant que celui-ci est sous tension pourrait être un mécanisme indispensable à la formation des jonctions cellule-cellule en sortie de mitose et à la migration corrélée des cellules filles, contribuant ainsi à **l'intégrité tissulaire** et à la **morphogenèse**.

2. Article en cours de publication

ESCRT-III assembly and cytokinetic abscission are induced by tension release in the intercellular bridge

Authors:

Julie Janvore[1], Paolo Maiuri[1], Irène Wang[2], Martial Balland[2], Matthieu Piel[1]*.

Affiliations:

[1]Institut Curie, CNRS UMR 144, 26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France.

[2]Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, CNRS/UJF, UMR5588, 140 Avenue de la Physique, 38402, Saint Martin d'Heres, France.

*Correspondence to: matthieu.piel@curie.fr

Abstract:

The last step of cell division, cytokinesis, produces two daugher cells which remain connected by an intercellular bridge. In many cases, this connected state represents the longest part of the whole division process. Severing the bridge, a process termed abscission, requires a now well-described series of molecular events, but what triggers abscission remains unknown. In this work, we show that pulling forces exerted by daughter cells on the intercellular bridge are a major regulation factor. Counter-intuitively, these forces prolonged the connected state, while a release of tension in the bridge induced abscission. Tension release triggered the assembly of the Endosomal Sorting Complex Required for Transport III (ESCRT-III), which was followed by membrane fission. We propose that this mechanism allows daughter cells to remain connected until they have settled in their final locations, a process potentially important for tissue organization and morphogenesis.

One Sentence Summary:

The forces that daughter cells exert on the bridge that links them after mitosis delay ESCRT-III assembly and thus abscission, while a release of these forces induces abscission

Main Text:

Abscission was long thought to be an unimportant step in cytokinesis, triggered merely by the cells pulling strongly enough on the bridge to rupture it *(1)*. Over the past ten years, however, research has proved this picture to be wrong and instead revealed a complex molecular machinery under tight regulation. A recent body of work has identified several elements required for cutting the cytokinetic bridge: endosome-dependent transport of components to the bridge *(2, 3)*, the removal of actin filaments *(4)* while maintaining the stability of the bridge structure until it is cut *(5, 6)*, the severing of the microtubule bundle *(7)*, and membrane fission *(8)*. When these processes are perturbed, dividing cells either remain connected and form a large syncytium (a process that naturally occurs during spermatogenesis *(9)*), or the bridge opens and the two daughter cells fuse leading to a binucleated cell, which has been postulated to be a potential early tumorigenic event *(10, 11)*. ESCRT complexes play a central role in abscission *(12, 13)*. They assemble into a conical structure in the very final cutting step *(14, 15)*, recruit the microtubule-severing enzyme Spastin *(16)* and induce membrane fission *(17)*. The molecular processes involved are now well described, but what triggers abscission is not yet understood. Puzzlingly, reported abscission times can vary from about one hour after anaphase *(18)* to three hours or even more *(4),* even within similar cell lines. Abscission corresponds to the definitive separation of the two daughter cells which constitutes, after chromatid separation, the second irreversible step of cell division. Most variability in the timing of mitosis comes from the spindle assembly checkpoint which delays chromatid separation. Similarly, most of the variability in the timing of cytokinesis comes from the timing of cytokinetic bridge abscission, suggesting the existence of a regulatory mechanism. The abscission checkpoint, or no-cut pathway, which is activated by the presence of DNA in the bridge *(18–20),* has been shown to induce long delays in abscission. But in control cell cultures, such bridges are seen only in a few per cent of cells and thus cannot explain the global asynchrony of abscission.

Our aim has been to identify major intrinsic or extrinsic factors regulating abscission timing and their associated molecular events. Quantitative approaches applied to large image datasets have identified local cell density as a major source of phenotypic heterogeneity in cultured cells *(21)*. It has also been proposed that cell adhesion to extracellular matrix might regulate cytokinesis *(22, 23)*. To assess these aspects, we used a cell line studied in several recent publications on abscission (HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP and histone2B-mCherry *(18)*). Histone2B recording allowed us to systematically discard cells with a DNA bridge. By varying substrate coating (glass or fibronectin) and cell density, we observed that cells plated on glass and cells plated at high density on fibronectin formed dense colonies with reduced spreading and motility compared with cells plated at low density on fibronectin, which displayed high motility and remained isolated and spread. We found that the time from anaphase to abscission (abscission time) was similar for cells plated on glass and at high density on fibronectin, but that abscission time increased with decreasing cell density (Fig. 1A and C, Movie S1). These results thus exclude a direct effect of

substrate coating, but suggest that abscission time is shorter when cells are more packed. To discriminate between an effect of cell capacity to spread and move after mitosis and an effect of cell:cell contact, we plated single cells on fibronectin disk-shaped micropatterns of various diameters. On small disks (40 µm diameter), cells were strongly confined and thus unable to spread or separate further after division, while on large disks (80 µm), cells behaved similarly to those plated at low density on fibronectin, spreading and moving freely. Abscission time increased with increasing disk size (Fig. 1B and D, Movie S2). We obtained similar results with thin fibronectin bar-shaped micropatterns that imposed a given maximal separation on the daughter cells, but restrained their spreading area (Fig. S1). These results suggest that abscission time was not modulated by cell:cell contact or cell spreading but rather by the capacity of daughter cells to move apart from each other after division. Counter-intuitively, the more cells could move apart, the longer the delay in abscission.

To confirm this finding, we measured the separation speed during post-mitotic re-spreading of daughter cells (distance between cells 30 minutes after anaphase) in conditions where cells were free to move. We indeed found a strong positive correlation between separation speed and abscission time: the faster the cells the longer the abscission time (Fig. 2A). This pointed to a potential inhibitory role of the forces cells exerted on their connecting bridges. To assess this aspect, we used traction force microscopy to measure the forces cells exerted on their substrate (*(24, 25)*, Fig. 2B, Fig. S2, Movie S3 and Sup. Methods). From the force field (Fig. 2C and Movie S4) we could extract the total contractile energy of the cell doublet (sum of force magnitude multiplied by displacement) as a function of time after anaphase (Fig. 2D). As previously reported, this energy rose during cell re-spreading *(1)*, and most of the time, reached a plateau prior to abscission. We measured the height of this plateau, as well as the average contractile energy prior to abscission, and found a positive correlation with abscission time (Fig. 2E): the higher the contractile energy of the cell doublet, the longer the abscission time. During early re-spreading, cells are mostly separating from each other and contractile energy should thus be correlated to the tension in the bridge. All together, these results, contrary to what has been proposed before *(1)*, suggest that forces cells exert on the cytokinetic bridge delay its abscission.

To describe which step is delayed more precisely, we performed a detailed analysis of microtubule severing, which has been shown to be a limiting step in abscission *(14)*. We found that microtubule bundle disassembly could occur in three major ways, which we name modes A, B and C. Mode A corresponds to the stereotypical mode described in previous reports, with a clear severing of the microtubule bundle on one side of the midbody (the central piece of the bridge), shortly followed by severing on the other side (Fig. S3, Movie S5 and S6). In mode B, the microtubule bundle slowly disappeared, with no clear severing (Fig. S3), a phenotype very similar to the siRNA knockdown phenotype of Spastin (Fig. S4C, D and E). In mode C, microtubules were not severed but the whole bundle detached from one cell; this was not followed by membrane fission (Fig. S3). Modes B and C were mostly found when cells were plated at low density on fibronectin, showed high post-mitotic separation speed

and corresponded to the longest abscission times (Fig. S4, see further discussion in supplementary information). We propose the following working model: when daughter cells re-spread after anaphase, they exert a force on the cytokinetic bridge and this force delays the severing of microtubules by Spastin. When the force is maintained, the process is completely inhibited, leading to mode B abscission with slow microtubule disassembly. When the force is too strong, the bundle detaches from one of the daughter cells, leading to mode C abscission.

A prediction of this model is that cells that do not pull on the bridge, or stop pulling, would undergo abscission rapidly. Pulling forces would lead to a straight bridge, while no pulling force, or pushing forces, would lead to a loose or even bent bridge. There was indeed a clear correlation between abscission time and straightness of the bridge (inserts on Fig. 1 and S1). We could even observe a good correlation between the maximum length of the bridge and abscission time for mode A, while in modes B and C, bridges were generally longer but abscission time reached a plateau (Fig. S4F). To test our hypothesis more directly, we designed fibronectin micropatterns composed of twin features that fixed the distance between daughter cells after division (Fig. S5A). We compared a small disk pattern on which cells could remain in close contact, and twin brackets, of similar radius, but on which no adhesion was allowed in the central region, forcing cells to stay separated. On this second type of pattern, bridges remained straighter and abscission time was longer (Fig. S5B). We could also often observe, on twin patterns, that the two daughter cells would transiently move towards one another. This movement, which we termed a ‘kiss’, led to a bending of the bridge, shortly followed by abscission (Fig. S5C). We quantified the timing between anaphase and ‘kiss’, between ‘kiss’ and abscission on one side (‘cut1’) and between abscission on one side and abscission on the other side (‘cut2’). This analysis shows that most of the variability in timing was between anaphase and ‘kiss’ (Fig. S5D). Timing between ‘kiss’ and ‘cut1’ was very short and similar to timing between ‘cut1’ and ‘cut2’ (Fig. S5E and F). To check whether this was a general behavior of post-mitotic cells, we tracked daughter cell nuclei for cells dividing on unconstrained fibronectin-coated substrates. This allowed us to compute both the speed of cells relative to the substrate as well as their separation speed. To compare the behavior of different pairs of daughter cells, we normalized both time and distances relative to timing and distances at anaphase and abscission. This suggested that cells slow down after anaphase, with a minimal speed reached just before abscission (Fig. S5G). After abscission, they resumed migration. Computing separation speed showed that daughter cells mostly moved apart after anaphase, but at gradually decreasing speed. Strikingly, about 10 minutes before abscission, they instead transiently moved towards each other (negative separation speed, Fig. S5H). These results are consistent with our working model: as long as the bridge is under tension, abscission is delayed, while a release of tension rapidly results in abscission.

The consistent short time between ‘cut1’ and ‘cut2’ (Fig. 3A) suggests that ‘cut2’ could be triggered by ‘cut1’ because of the release of tension in the bridge following ‘cut1’.

Alternatively, an upstream signal could directly trigger both 'cut1' and 'cut2', independently of tension. A direct test of our model would thus be to artificially cut the bridge on one side and check whether this induced release of tension is enough to trigger the cut on the other side. We performed this experiment using laser ablation. We chose cells with a well-formed and straight bridge and checked that they were indeed under tension. When we cut one side of the bridge it rapidly retracted, in a similar fashion to a ruptured spring under tension (Fig. S6C, D and E, Movie S7). We followed microtubules in the remaining half-bridge after ablation: the central part was stable and a cut on the other side was observed shortly after (Fig. 3B white arrows and Movie S8). We quantified timing between ablation and this second 'cut' and found that the timing was similar to the timing between 'cut1' and 'cut2' in control cells (Fig. 3D). Control ablation of another part of the cell did not induce abscission (Fig. 3C and D, Movie S8). To rule out a non-specific effect of ablation on microtubule disassembly, we depleted key abscission proteins by siRNA: Spastin, which is essential for microtubule severing in mode A abscission (Fig. S4), and CHMP2A (Charged Multivesicular body Protein 2A), an essential component for ESCRT-III complex assembly (*(14)*, Movie S9, Fig. S7D for siRNA efficiency). Ablation of one side of the bridge in Spastin-depleted cells led to the characteristic ESCRT-III-dependent pinching of the bridge on the other side but was not followed by microtubule severing (Fig. 3E, G, H, and Fig. S6F for control siRNA). This showed that the induced microtubule severing was Spastin-dependent and was not a non-specific microtubule disassembly. Ablation of one side of the bridge in CHMP2A-depleted cells did not lead to any pinching and was not followed by any microtubule severing (Fig. 3F, G and H). This is what we expected, because Spastin is targeted to the bridge by ESCRT components *(16)*. This set of experiments showed that ablation of one side of the bridge induced the regular ESCRT-III/Spastin abscission pathway on the other side.

All together our results suggest that the release of tension in the bridge induces ESCRT-III assembly, which in turn leads to pinching of the side of the bridge and the severing of microtubules by Spastin. To directly investigate this point, we followed the localization of CHMP4B-GFP, one of the ESCRT-III components that forms the late ESCRT cone preceding abscission *(14, 15)*. We used stable BAC HeLa cells expressing this protein at endogenous levels *(26)*. As previously described *(14, 15)*, we observed that CHMP4B-GFP was first recruited to both sides of the midbody, forming two narrow bands (Fig. 4A). One of the bands then extended on one side, concomitant with a narrowing of the bridge on that side and a severing of microtubules (Fig. 4A white arrows); a similar process then took place on the other side of the midbody (Movie S10). We also performed siRNA knockdowns of Spastin and CHMP2A in these cells and observed the expected phenotypes (Fig. S7B and C and supplementary information). To identify the stage of bridge cleavage triggered by the release of tension, we performed laser ablation experiments at different stages, based on CHMP4B-GFP staining at the bridge. When ablation was performed after CHMP4B-GFP had been recruited at the central piece of the bridge, it was followed within 10 minutes by assembly of the CHMP4B-GFP conical structure on the other side, concomitant with pinching

of the bridge and microtubule severing, with the expected kinetics (Fig. 4B and C, Movie S11). Ablation performed on bridges before any CHMP4B-GFP was visible lead to transient recruitment of CHMP4B-GFP within 10 minutes but no subsequent cone formation or abscission; abscission eventually occurred later, with a similar delay as for a control ablation. We also performed ablations in cells depleted for Spastin and CHMP2A. As expected, ablations in Spastin-depleted cells led to the formation of CHMP4B-GFP conical structures and pinching of the bridges with normal timing but was not followed by microtubule severing, while ablation in CHMP2A-depleted cells did not trigger any CHMP4B-GFP conical structure assembly nor microtubule severing (Fig. 4D). These results show that tension release following ablation specifically induces the very last step of abscission, the assembly of the ESCRT-III conical structure (Fig. 4E).

Is a delay in the last step of abscission enough to explain the observed variability in abscission time? We performed analysis of high resolution time-lapse movies of cells dividing on fibronectin at medium density, a condition which displayed variability in abscission time. We quantified the length of the various stages of the bridge cleavage process, following CHMP4B-GFP and α-tubulin-RFP. We concentrated on mode A cleavages (see supplementary information for modes B and C), which shows a clear microtubule severing sequentially on both sides of the midbody. We found that timing between anaphase and the appearance of CHMP4B-GFP at the midbody was less variable (in terms of mean divided by variance) than the delay between appearance of CHMP4B-GFP at the bridge and conical structure assembly (Fig. 4F). Nevertheless, plotting total abscission time versus these durations showed a good correlation (Fig. 4G-H). This shows that the origin of variability in abscission time comes both from the accumulation of ESCRT-III components at the midbody, and the delay in assembly of the ESCRT-III conical structure.

Our results have allowed us to identify a major source of variability in abscission time: the forces exerted by daughter cells on the cytokinetic bridge. To re-spread after mitosis, daughter cells pull on their substrate. Depending on their environment, part of this force is transmitted to the cytokinetic bridge linking the two cells. This results in a delayed assembly of ESCRT-III and thus in delayed abscission (Fig. S8). We measured separation speed in another cell line showing longer abscission time and found a similar relationship between these two parameters (Fig. S9 and supplementary information). This suggests that the variability in abscission time reported in different cell lines can be simply explained by differences in separation speed.

How do forces acting on the bridge delay ESCRT-III assembly? Membrane tension, or local curvature could directly affect ESCRT assembly, as previously proposed in other contexts for other membrane fission mechanisms *(27)* and for curvature *(28)*. Alternatively, mechanically induced signaling processes might be involved: e.g. RhoA regulation is involved both in mechanotransduction *(29)* and abscission *(30)*. We note that mechanisms involved in the regulation of abscission timing are reported to rely on the regulation of ESCRT complexes at

the midbody: TEX14 prevents recruitment of ESCRT complexes at the midbody during spermatogenesis *(9)*; Cep55 phosphorylation by Plk1 coordinates the beginning of the ESCRT machinery recruitment at the midbody with the end of the furrow ingression *(31)*; and CHMP4C (an ESCRT-III component) phosphorylation by AuroraB prevents abscission when DNA is present in the bridge *(20)*. Here, we also found that tension in the bridge delays the assembly of ESCRT-III.

What is the function of tension-regulated abscission timing? If one considers cytokinetic cells in a tissue under tension, daughter cells might be pulled apart by neighboring cells, resulting in a force exerted on the intercellular bridge. Delaying abscission for as long as such forces are acting on the bridge would allow daughter cells to re-establish cell-cell adhesions, thus avoiding a rupture in the tissue (Fig. S10). It has also been reported that, during development of the neural tube in zebrafish, daughter cells undergo mirror-symmetric movement after division, which leads to a general symmetric organization of the tissue prior to the opening of the tube *(32)*. We speculate that this symmetric movement of daughter cells is made possible by a stabilized bridge under tension, which informs each cell about the position of its daughter and makes symmetric migration possible. Once daughter cells reach their final position in the tissue, they stop moving, meaning that forces on the bridge would decrease and abscission would proceed. We indeed observe, *in vitro*, that daughter cells persistently migrate away from each other as long as they are connected by the bridge, and often stop migrating or migrate in an uncorrelated manner after abscission (Fig. S11 and supplementary information). We thus propose that post-mitotic cells possess a sensory mechanism that delays abscission by preventing ESCRT-III assembly as long as forces are exerted on the cytokinetic bridge. This mechanism would allow daughter cells to re-establish connections after mitosis - thus preventing tissue rupture or cell loss - and achieve correct relative positioning, which might be a novel morphogenetic mechanism.

References and Notes:

1. K. Burton, D. L. Taylor, Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata, Nature **385**, 450-4 (1997).
2. G. M. Wilson et al., The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis, *Molecular biology of the cell* **16**, 849-60 (2005).
3. I. Kouranti, M. Sachse, N. Arouche, B. Goud, A. Echard, Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis, *Current biology* **16**, 1719-25 (2006).
4. D. Dambournet et al., Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis, *Nature cell biology* **13**, 1-10 (2011).
5. A. Kechad, S. Jananji, Y. Ruella, Anillin Acts as a Bifunctional Linker Coordinating Midbody Ring Biogenesis during Cytokinesis, *Current Biology* **22**, 197-203 (2012).

6. K.-C. Su, T. Takaki, M. Petronczki, Targeting of the RhoGEF Ect2 to the Equatorial Membrane Controls Cleavage Furrow Formation during Cytokinesis, *Developmental Cell* **21**, 1104-1115 (2011).
7. J. W. Connell, C. Lindon, J. P. Luzio, E. Reid, Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion, *Traffic* **10**, 42-56 (2009).
8. J. G. Carlton, J. Martin-Serrano, Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery, *Science* **316**, 1908-12 (2007).
9. T. Iwamori et al., TEX14 interacts with CEP55 to block cell abscission, *Molecular and cellular biology* **30**, 2280-92 (2010).
10. T. Fujiwara et al., Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells, *Nature* **437**, 1043-7 (2005).
11. B. Lacroix, A. S. Maddox, Cytokinesis, ploidy and aneuploidy, *The Journal of pathology* **226**, 338-51 (2012).
12. J. Guizetti, D. W. Gerlich, Cytokinetic abscission in animal cells, *Seminars in cell & developmental biology* , 1-8 (2010).
13. A. Caballe, J. Martin-Serrano, ESCRT machinery and cytokinesis: the road to daughter cell separation, *Traffic* **12**, 1318-26 (2011).
14. J. Guizetti et al., Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments, *Science* **331**, 1616-20 (2011).
15. N. Elia, R. Sougrat, T. a Spurlin, J. H. Hurley, J. Lippincott-Schwartz, Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission, *PNAS*, 1-6 (2011).
16. D. Yang et al., Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B, *Nature structural & molecular biology* **15**, 1278-86 (2008).
17. W. M. Henne, N. J. Buchkovich, S. D. Emr, The ESCRT Pathway, *Developmental cell* **21**, 77-91 (2011).
18. P. Steigemann et al., Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization, *Cell* **136**, 473-84 (2009).
19. C. Norden et al., The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage, *Cell* **125**, 85-98 (2006).
20. J. G. Carlton, A. Caballe, M. Agromayor, M. Kloc, J. Martin-Serrano, ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C, *Science* (2012)
21. B. Snijder et al., Population context determines cell-to-cell variability in endocytosis and virus infection, *Nature* **461**, 520-3 (2009).
22. T. Pellinen et al., Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis, *Developmental cell* **15**, 371-85 (2008).
23. C. G. Reverte, A. Benware, C. W. Jones, S. E. LaFlamme, Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis, *The Journal of cell biology* **174**, 491-7 (2006).
24. M. Dembo, Y.-li Wang, Stresses at the Cell-to-Substrate Interface during Locomotion of Fibroblasts, *Biophysical Journal* **76**, 2307-2316 (1999).
25. J. Wang, B. Li, R. H. Gavin, Ed. Application of cell traction force microscopy for cell biology research, *Methods in Molecular Biology* **586**, 301-313 (2009).
26. I. Poser et al., BAC TransgeneOmics, *Nature methods* **5**, 409-415 (2010).
27. A. Roux, K. Uyhazi, A. Frost, P. De Camilli, GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission, *Nature* **441**, 528-31 (2006).

28. I. Fyfe, A. L. Schuh, J. M. Edwardson, A. Audhya, Association of ESCRT-II with VPS20 generates a curvature sensitive protein complex capable of nucleating filaments of ESCRT-III, *The Journal of biological chemistry* **286**, 34262-34270 (2011).
29. M. a Wozniak, C. S. Chen, Mechanotransduction in development: a growing role for contractility, *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 34-43 (2009).
30. P. Morin, C. Flors, M. F. Olson, Constitutively active RhoA inhibits proliferation by retarding G(1) to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis, *European journal of cell biology* **88**, 495-507 (2009).
31. R. N. Bastos, F. a Barr, Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission, *The Journal of cell biology* **191**, 751-60 (2010).
32. M. Tawk et al., A mirror-symmetric cell division that orchestrates neuroepithelial morphogenesis, *Nature* **446**, 797-800 (2007).
33. J. a Schiel et al., Endocytic membrane fusion and buckling-induced microtubule severing mediate cell abscission., *Journal of cell science* **124**, 1411-24 (2011).
34. J. Fink et al., External forces control mitotic spindle positioning, *Nature cell biology* **13**, 771-8 (2011).
35. A. Azioune, M. Storch, M. Bornens, M. Théry, M. Piel, Simple and rapid process for single cell micro-patterning, *Lab on a chip* **9**, 1640-2 (2009).
36. Q. Tseng et al., A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels, *Lab on a chip* **11**, 2231-40 (2011).
37. B. Sabass, M. L. Gardel, C. M. Waterman, U. S. Schwarz, High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances, *Biophysical journal* **94**, 207-20 (2008).

Acknowledgments:

We thank D. Gerlich for the Hela Kyoto α-tubulin-EGFP histone2B-mCherry cell line and the α-tubulin plasmids, I. Poser and A. Hyman for the CHMP4B-GFP cell line. We gratefully acknowledge A. Roux, A. Echard, N. Minc, C. Janke and members of the Piel lab for the critical reading of the manuscript; V. Fraisier, L. Sengmanivong, the Nikon Imaging Center and the PICT-IBiSA of the Institut Curie for technical support in microscopy; E. Terriac and A. Jimenez for helpful discussions. This work was supported by a French ministerial fellowship to J.J., a Fondation pour la Recherche Medicale fellowship to J.J. and to P.M., and a Ligue Contre le Cancer grant to M.P..

FIGURE 1

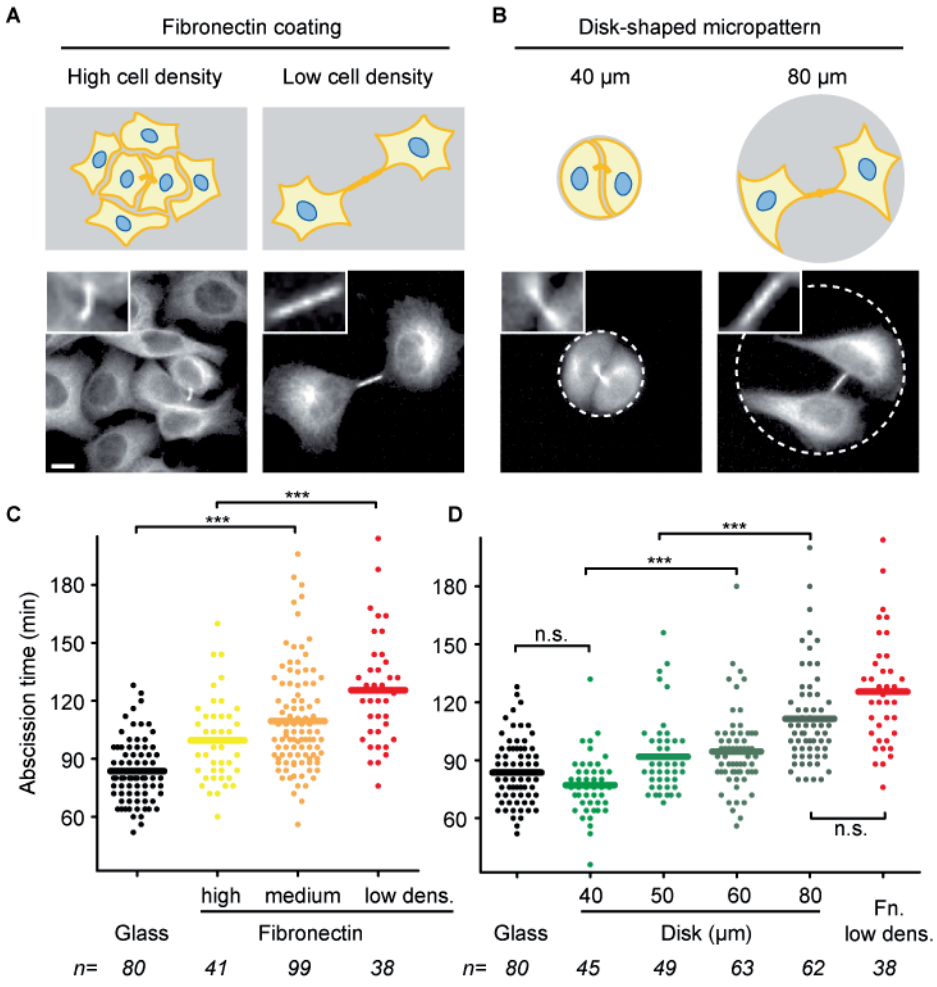


Fig. 1. Low spatial confinement of daughter cells delays abscission. (A) and (B) Top, experimental setup to control the spatial confinement of daughter cells. *Fn.* for Fibronectin. Bottom, representative images of daughter cell morphology under different spatial confinement conditions (visualized by α-tubulin-EGFP signal). Top left corner is a zoom (4 times) on the intercellular bridge. Scale bar 10 µm. (C) and (D) Quantification of abscission time. Each dot represents one daughter cell doublet and mean is shown as a bar. *** for *P* value < 0.0001 (Kruskal Wallis test), *n.s.* for not significant.

FIGURE 2

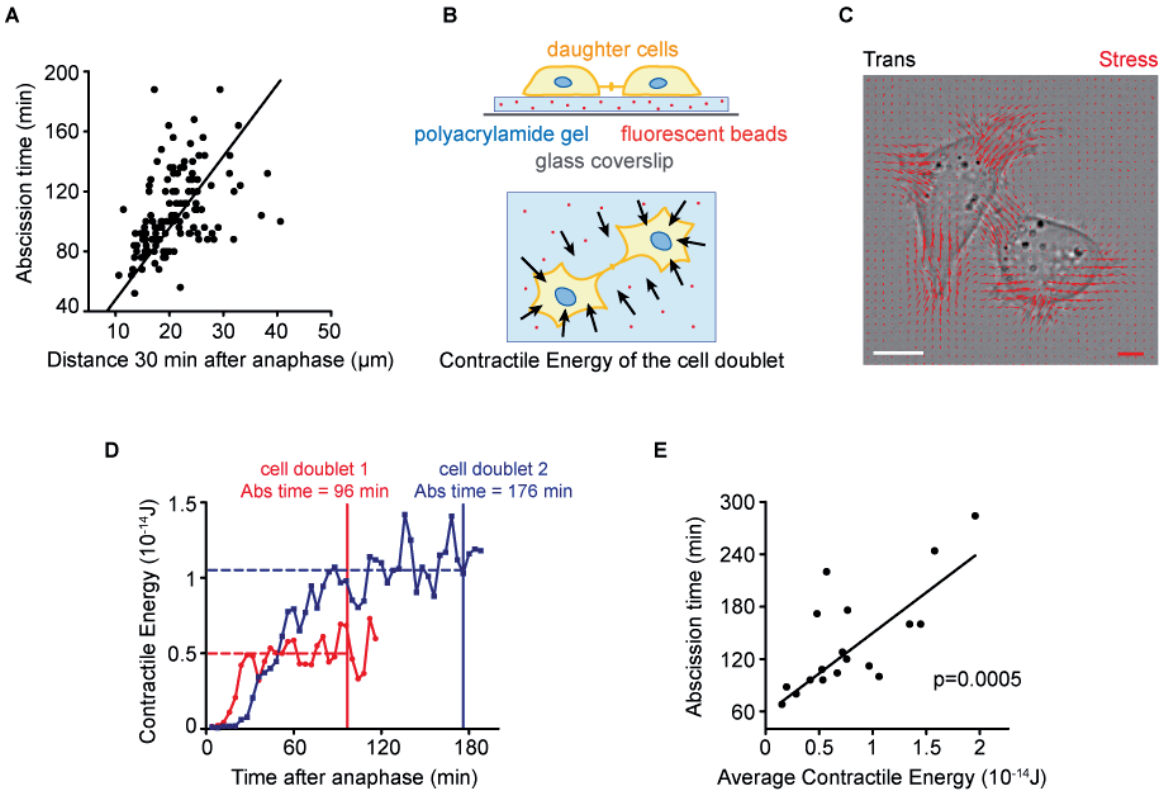


Fig. 2. Motility and contractility of daughter cells delay abscission. (A) Abscission time as a function of the distance between daughter cells 30 min after anaphase. *n*=126. Each dot represents one daughter cell doublet, the line is shown as guideline (linear fit passing through the origin). (B) Traction force microscopy setup (see Material and Methods). (C) Overlay of phase contrast image and calculated stresses. Scale bars are 10 µm (white) and 200 Pa (red). (D) Evolution of the Contractile Energy (10^{-14} Joules) after anaphase for two cell doublets (red and blue). Continuous lines show abscission, dotted lines show the plateau. (E) Abscission time as a function of the Average Contractile Energy of the daughter cells doublet. *n*=18, *P* value of Pearson test (linear fit).

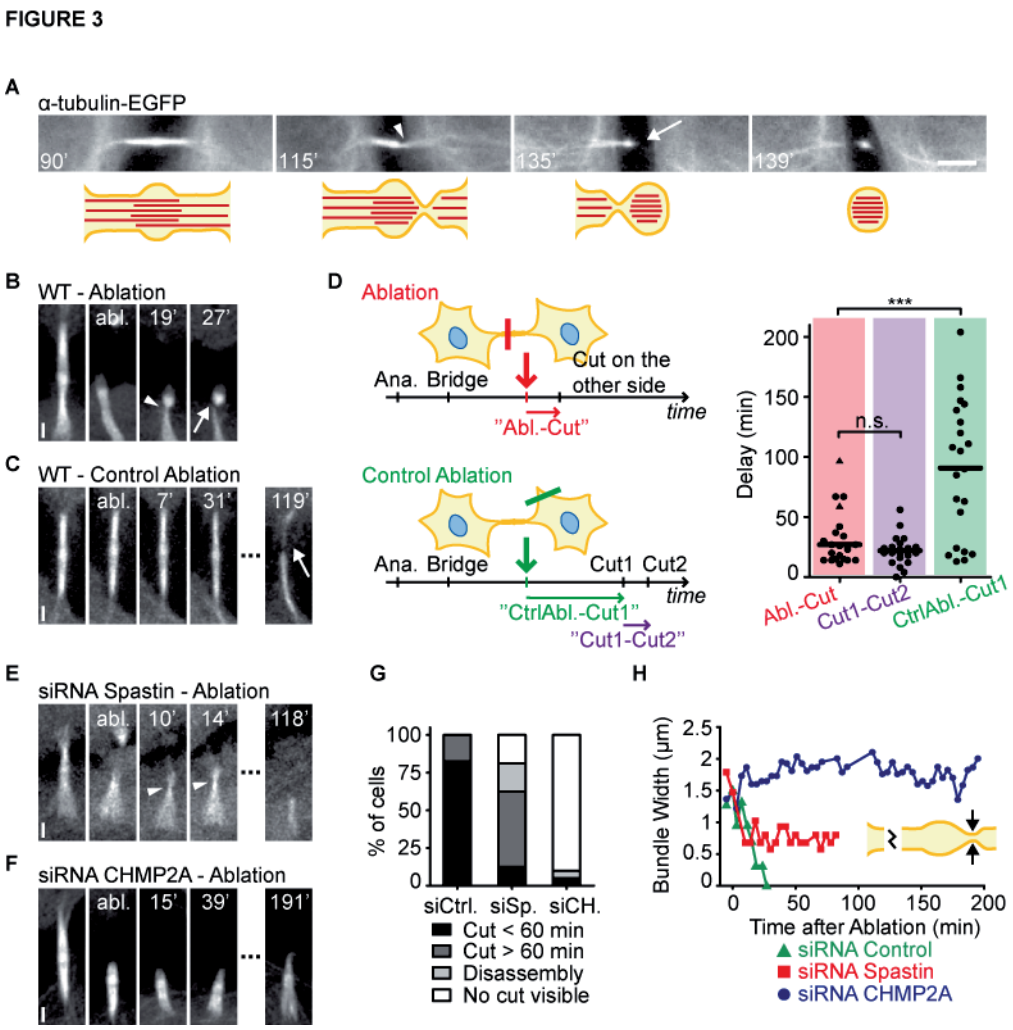


Fig. 3. Artificial release of tension in the bridge induces abscission. (A) Time-lapse sequence of the abscission process visualized by α-tubulin-EGFP signal. Scale bar 10 µm. Throughout the figure, time is minutes after anaphase or after ablation, arrowhead shows the pinching of the microtubule bundle, arrow shows abscission. (B) Ablation on one side of the bridge and (C) control ablation, performed on Hela Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP and histone2B-mCherry. First image is before ablation, *abl.* is ablation, scale bars 2 µm. (D) Quantification of delays between the ablation and the cut on the other side of the bridge (red, *n*=18), between the first cut and the second cut in control cells (purple, *n*=23), between the control ablation and the abscission (green, *n*=21). *** for *P* value < 0.0001 (Kruskal Wallis test), *n.s.* for not significant. (E) and (F) Ablation performed respectively on siRNA Spastin treated cells and siRNA CHMP2A treated cells. Scale bars 2 µm. (G) For siRNA Control (*n*=17), siRNA Spastin (*n*=16) and siRNA CHMP2A (*n*=20) treated cells, percentage of cells showing abscission after the bridge ablation with a delay shorter than 60 min (black), longer than 60 min (dark grey), a slow disassembly of the microtubule bundle (light grey), or keeping the half bridge intact after ablation for more than 180 min (white). (H) Evolution of the bundle width after ablation for siRNA control (green triangles), siRNA Spastin (red squares) and siRNA CHMP2A (blue spots) treated cells.

FIGURE 4

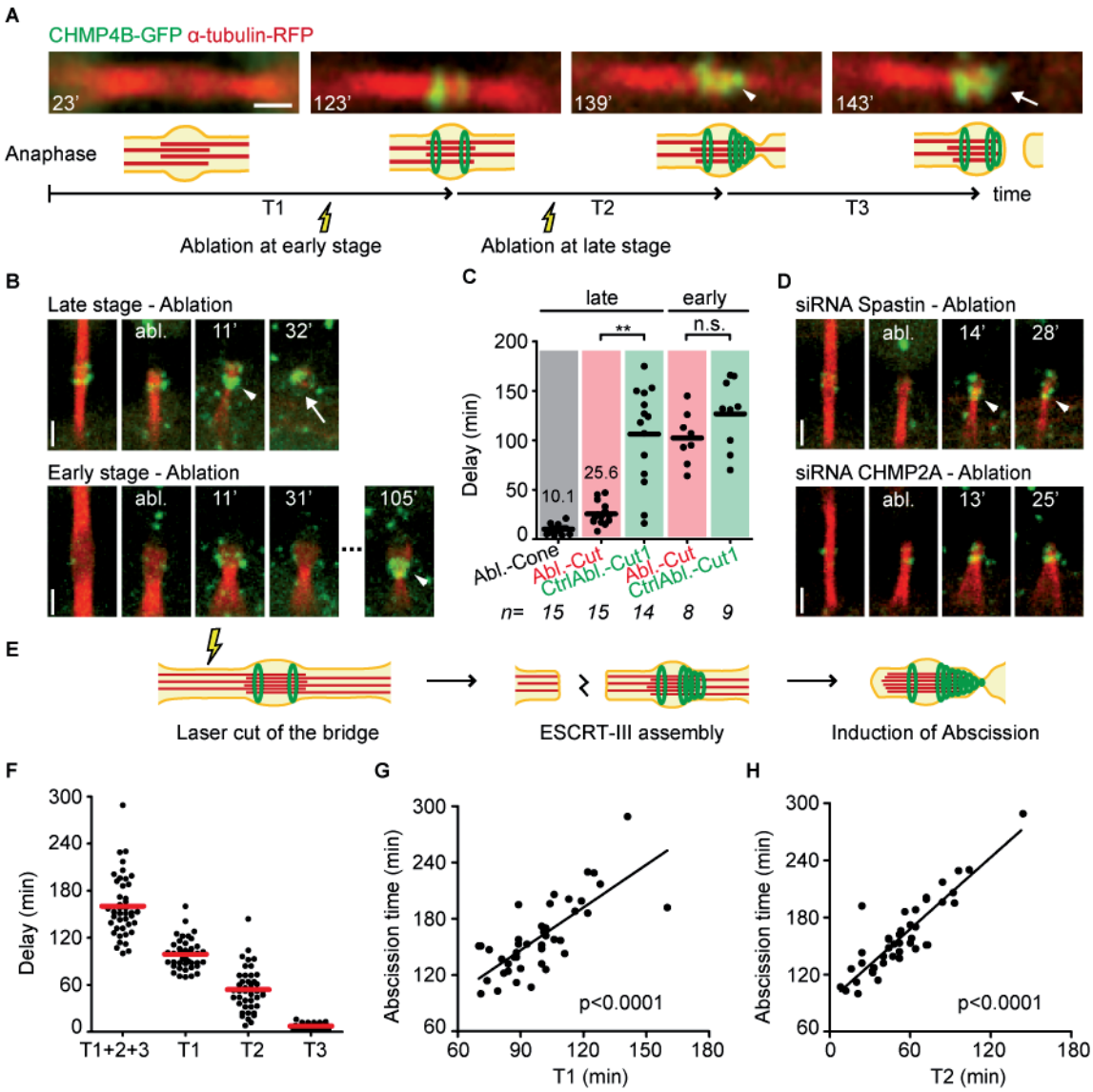


Fig. 4. ESCRT-III assembly is regulated in time by forces exerted on the bridge. (A) Time-lapse sequence of the bridge cleavage process visualized by CHMP4B-GFP (green) and α-tubulin-RFP (red) signals. Time is minutes after anaphase, arrowhead shows the pinching of the microtubule bundle and the formation of the ESCRT-III conical structure, arrow shows abscission, scale bar 2 µm. (B) Ablation performed at late stage (top) and early stage (bottom). First image is before ablation, *abl.* is ablation. (C) Quantification of delays between the ablation and the formation of the ESCRT-III cone on the other side of the bridge (grey), between the ablation and the abscission (red), between the control ablation and the abscission (green). Quantification for late (left) or early (right) stages. ** for *P* value < 0.05 (Kruskal Wallis test), *n.s.* for not significant. (D) Ablation performed on siRNA Spastin (top) and siRNA CHMP2A (bottom) treated cells. (E) Proposed model: cell membrane (yellow), microtubules (red) and ESCRT-III (green) are shown. (F) Quantification of the delays described on the scheme in (A). *n*=42. (G) Abscission time as a function of the delay between

anaphase and the beginning of the ESCRT-III recruitment at the midbody. (H) Abscission time as a function of the delay between the beginning of the ESCRT-III recruitment at the midbody and the formation of the ESCRT-III conical structure on the side of the midbody. *P* value of Pearson test (linear fit).

Supplementary Materials Contents:

- Supplementary information
- Materials and Methods
- Figures S1-S11
- Movies S1-S11
- References *(33-37)*

Supplementary Materials:

Supplementary information:

1. Abscission modes A, B and C (Fig. S3 and S4)

Figure S3 shows careful examination of microtubule dynamics during the abscission process, revealing some heterogeneity. Some cells displayed regular microtubule severing on one side of the central piece of the bridge, then on the other side, as reported in several recent publications *(14, 15)* We call this behaviour mode A. Other cells did not show this clear microtubule severing, but instead a slow disassembly of the bundle (mode B). The difference between the two modes is apparent when considering the intensity of the bundle over time (Fig. S3C). In mode A, an abrupt diminution can be observed, while mode B shows a constant slow decrease. In mode C, the whole bundle detaches from one of the daughter cells without any diminution in the microtubule signal. In the example shown, the bundle reconnects with the cell later on and microtubules are eventually severed.

Figure S4 shows the distribution of the different modes in various experimental conditions. Cells plated on bare glass almost only display mode A, but when plated on fibronectin at low density, they display mostly modes B and C (Fig. S4A). Modes B and C also correspond to longer abscission times than mode A (Fig. S4B). In Spastin-depleted cells, microtubule bundle disassembly strongly resembles mode B, with a stronger delay in abscission time (Fig. S4C, D and E). We also plotted graphs showing the correlation between the separation speed of daughter cells and abscission time (Fig. S4G), and between maximal length of the bridge and abscission time (Fig. S4F), color coded for the different modes. It appears that mode A shows a good correlation in both cases. Modes B and C are found in the longest bridges and the fastest-separating cells but show less correlation, which suggest that they correspond to modes in which the mechanism which couples abscission time to tension in the bridge is fully inhibited.

2. CHMP4B-GFP in modes B and C and in siRNA treated cells (Fig. S7)

We observed that cells displaying modes B and C abscission (as judged by the microtubule bundle behavior) had a defect in CHMP4B-GFP recruitment at the midbody (Fig. S7A). As

described in previous reports *(14, 15)*, in mode A, CHMP4B-GFP is recruited in two bands on either side of the central piece of the bridge (Movie S10, Fig. 4A and Fig. S7A left) A conical structure then appears on one side (white arrow head), followed shortly by microtubule severing and abscission. In mode B (Fig. S7A middle panel), CHMP4B-GFP forms an amorphous aggregate instead of two clear bands, resembling the CHMP2A siRNA knockdown phenotype (Fig. S7C), while in mode C, there was little or no CHMP4B-GFP visible at the midbody. A small dot was sometimes visible prior to abscission (Fig. S7A right panel). This suggested that, in these extreme cases of pulling forces and bridge elongation, even the recruitment and the organization of ESCRT-III at the midbody might be affected, probably explaining the subsequent defect in microtubule disassembly and the atypical mode of cleavage. In such cases, endosome fusion and buckling-induced severing of the microtubules could compensate ESCRT-III misfunction *(33)*. It could also be that the recently-described CHMP4C dependent regulation of abscission timing is involved *(20)*.

In cells depleted for Spastin, CHMP4B assembled normally, conical structures appeared alternately on both sides of the midbody, pinching the bridge, but this was not followed by microtubule severing. This happened several times on both sides of the midbody, while the microtubule bundle slowly thinned and eventually led to delayed abscission (Fig. S7B, left panel, white arrowheads). In CHMP2A-depleted cells, CHMP4B was recruited at the midbody, but accumulated as a single amorphous aggregate, as opposed rather than the two bands observed in controls, and no conical structure appeared. We detected no pinching of the bridge and no microtubule severing. This lead to a completely inhibited abscission (Fig. S7C right panel).

3. Abscission time in non-Kyoto HeLa cells (Fig. S9)

To further validate our hypothesis that the diversity in abscission time results from differences in the post-mitotic separation speed of daughter cells, we created another stable cell line expressing both α-tubulin-GFP and histone2B-mCherry, using a different source of HeLa cells displaying longer abscission times (Fig. S11A and B). We found that, like fast-separating Kyoto cells, these cells display mostly B and C abscission modes, even when plated in conditions under which the Kyoto cell line displays mostly mode A abscission.

We then plotted abscission time against both separation speed (Fig. S11D large open dots) and maximal bridge length (Fig. 11 SE large open dots). We found that these non-Kyoto HeLa cells indeed correspond to cells that separate faster and show longer bridges, and that the correlation of abscission timing with separation speed and bridge length still holds for these cells. They just appear to be shifted towards higher speeds and longer abscission times compared with Kyoto HeLa cells (Kyoto cells are displayed on the same graphs as small dots with the same color code, for comparison).

4. Post-mitotic correlated migration (Fig. S11)

To investigate the potential correlated migration of daughter cells prior to abscission, we recorded HeLa cells expressing both histone2B-mCherry and α-tubulin-EGFP. We tracked the movement of nuclei using automated homemade software, and we identified the timing of anaphase and the timing of abscission by visual inspection of the movies. This was performed both on fibronectin micropatterned lines (Fig. S11A), which restricts cell migration to 1D, and also on 2D unconstrained fibronectin-coated substrates (Fig. S11B). Both experiments led to similar results, although the result was more obvious on the micropatterned lines.

To compare cells with different post-mitotic migration speeds and abscission timings, both distance and time were normalized, so that time between anaphase and abscission was equal to 1, and time at abscission was chosen to be 0. Similarly, distance at abscission was 0 and at anaphase defined as -1, to make it easier to compare the same amount of time before and after abscission. Plotting this normalized distance as a function of normalized time showed that, with a few exceptions, cells would persistently move away from each other until abscission. This can also be seen in Fig. S5H, which shows a positive speed of separation except for a very brief period just prior to abscission. On the other hand, after abscission, the relative movement of daughter cells becomes random overall. Note that cells that deviate from the bisectrix always do so above it, meaning that they first separate faster and then come back closer to each other just prior to abscission. This is more obvious in the 2D case, in which all cell plots are above the bisectrix. The backward movement preceding abscission results in the negative separation speed just prior to abscission, shown in Fig. S5H.

Materials and Methods:

Cell lines and culture

The HeLa Kyoto cell line expressing α-tubulin-EGFP and histone2B-mCherry was provided by Daniel Gerlich *(18)*. To generate the non-Kyoto HeLa cell line (Fig. S11), we transfected a histone2B-mCherry stable cell line *(34)* with pmEGFP-α-tubulin-IRES-puro2b plasmid *(18)*. The CHMP4B-GFP α-tubulin-RFP cell line was produced by transfecting a HeLa Kyoto stable cell line expressing CHMP4B-GFP at endogenous level *(14, 26)* by the pmRFP-α-tubulin-IRES-puro2b plasmid *(18)*. Plasmid transfection was carried out using Lipofectamine LTX and Plus reagent (Invitrogen). For both cell lines, the double positive cells were selected by antibiotic resistance (G418 and puromycin) and sub-cloning. All cell lines were cultured in DMEM GlutaMAX medium (GIBCO, Invitrogen) complemented with 10% Fetal Bovine Serum (Biowest) and 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO, Invitrogen), at 37°C and 5% CO_2. For imaging, cells were kept in complemented Leibovitz's L-15 CO_2-independent medium (GIBCO, Invitrogen) without phenol red.

siRNA treatments

For control siRNA treatements, we used siRNA targeting GAPD (ON-TARGET*plus* Control Reagents, Dharmacon). For depletion of Spastin and CHMP2A we used published siRNAs, respectively AAACGGACGUCUAUAAUGA *(7)* and UCUAGUUUCUGUCGCUCGCGG *(14)*. SiRNA transfections were carried out by Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen), with 120 nM final concentration of siRNA and 4h of incubation. Cells were transfected 12h or 24h after seeding, then transfected a second time 24h after the first transfection, and finally used 24h after the second transfection. We used Universal Probe Library System (Roche) to verify by RT-qPCR the depletion efficiency (Fig. S7D).

Surface treatment and micropatterning

For non-micropatterned surfaces, we used 35-mm glass-bottomed dishes (Fluorodish, WPI) either not treated or coated with a 50 µg/ml solution of Fibronectin (Sigma) in PBS. We produced micropatterned coverslips as already described *(35)*. Briefly, after plasma activation (Plasma Cleaner, Harrick), we passivated the glass with PLL-g-PEG (Surface Solutions GmbH, 0.1 mg/mL in 10 mM Hepes pH 7.3). After washing with PBS and water, we illuminated the surface with deep UV light (UVO Cleaner) through a chromium synthetic quartz photomask (Toppan). Finally we incubated 1h with Fibronectin (50 µg/ml in 100mM $NaHCO_3$ pH 8.4) and plated the cells. For imaging, we used either magnetic chambers (Chamlide) or glued the treated coverslips on a bottom-less 6 wells plate (MatTek).

Videomicroscopy and abscission time quantification

For the abscission time study, we chose to work at low magnification but high resolution using a 20x dry objective with a high numerical aperture (Nikon 20x 0.75 NA DIC or Phase contrast). This allowed us to follow large numbers of cells undergoing mitosis and full cytokinesis, with enough resolution to follow the abscission process. We performed 20h-long movies with a 4 min time-lapse. As DNA-bridges have been reported to delay abscission *(18-20)*, we used the histone2B-mCherry signal to verify the correct segregation of chromosomes and excluded cells with DNA bridges from the analysis. In cells lacking DNA bridges, the severing of the microtubule bundle is followed very shortly by membrane fission *(18)*. Consequently we determined abscission by using fluorescent α-tubulin and checked the transmitted light or phase contrast images for membrane fission especially for Mode B and C cells. Abscission time was defined as the elapsed time from anaphase to abscission. The videomicroscopy was done either on an Eclipse T*i* inverted microscope (Nikon) or on an ImageXpress Micro (Molecular Devices). Image analysis was done on ImageJ and MetaMorph software (Molecular Devices).

Image acquisition for Traction Force Microscopy

Polyacrylamide gels were covalently attached to a glass-bottomed dish (Fluorodish, WPI). We used Acrylamide/Bis-acrylamide concentrations of 5%/0.1% and 7.5%/0.06%. 0.2 µm

dark-red (660/680), fluorescent microbeads (Molecular Probe) were embedded, and the gels were coated with fibronectin using Sulfo-SANPAH crosslinker (Pierce). The cells were plated at least 12h before use to allow for good spreading. For time-lapse imaging, we used an Eclipse T*i* inverted microscope (Nikon) with a 60x oil immersion objective (Nikon 60x 1.4 NA DIC) and a CoolSNAP HQ2 camera (Photometrics). Multiposition movies of 4-min time-lapse were started on metaphasic cells and performed until all the cells doublet abscised. Beads, phase contrast, histone2B-mCherry and α-tubulin-EGFP were recorded. At the end of the movie, cells were detached by trypsin (Gibco). To ensure good quality image of fluorescent beads, we performed Z stacks of 1 µm steps and automatically chose the best focus (MetaMorph software).

Traction force microscopy

Force calculations on continuous substrates were performed using a method that has been described previously *(36)*. We tracked fluorescent beads to obtain a displacement field with high spatial resolution. Using a combination of particle imaging velocimetry and particle tracking, the final displacement field is obtained on a regular grid with 0.84 µm spacing using linear interpolation. We reconstructed forces using the assumption that the substrate is a linear elastic half-space, using Fourier Transform Traction Cytometry (FTTC) with zeroth-order regularization *(37)*. The final stress field is obtained on a grid with 0.84 µm spacing. We estimated the evolution of cell contractile strength during division by calculating the strain energy U (forces multiplied by displacements in J), which represents the total energy transferred from the cell to the elastic distortion of the substrate. We estimate that errors account for less than 10% of the calculated forces. All calculations and image processing are performed in Matlab.

Laser ablation experiments

The laser ablation system was composed of a pulsed 355-nm ultraviolet laser (Roper Scientific) interfaced with an iLas system. The pulse was 400 ps at 10mW, 1 µJ per pulse, scanning at 25 µs per pixel. This system was mounted on a confocal spinning disk (Yokagawa CSU-X1 spinning head on a Nikon Eclipse T*i* inverted microscope) equipped with an EM-CCD camera (Evolve, Photometrics) and a 100x oil immersion objective (Nikon S Fluor 100x 0.5-1.3 NA). For optimal tension release in the bridge, we ablated both the plasma membrane and microtubule bundle. To visualize the release of tension in the bridge following the ablation, we performed very fast acquisition (5 ms time-lapse) using only the transmitted light channel (Movie S7 Fig S6C and D). The movement of the midbody was then tracked using MetaMorph software to realize the plot showed in Fig. S6E. Complete ablation of the bridge on one side was necessary to lead to bridge retraction. Indeed, when ablation was partial, the bridge did not retract and microtubules rapidly re-grew in the ablated region (Fig. S6B). It was also important to perform ablation on the side of the central piece, as ablation of the central piece immediately led to the complete disassembly of bridge microtubules on

both sides (Fig. S6A). For the long-term movie after ablation, we recorded 4-min time-lapse movie for 1 to 3 hours after ablation with 10 planes Z stacks of 0.6 µm steps around the intercellular bridge. The images shown are maximum Z-projection (MetaMorph software). The measurement of the bundle width (Fig. 3H) was performed on α-tubulin-EGFP images on the remaining half bridge after ablation, about 1 µm away from the central piece (midbody).

CHMP4B-GFP live-imaging

To follow CHMP4B-GFP localization during cytokinesis, we used either an Eclipse T*i* inverted microscope (Nikon) with a 60x oil immersion objective (Nikon 60x 1.4 NA DIC) and a CoolSNAP HQ2 camera (Photometrics), or a confocal spinning disk system (Yokagawa CSU-X1 spinning head on a Nikon Eclipse T*i* inverted microscope) equipped with an EM-CCD camera (Evolve, Photometrics) and a 100x oil immersion objective (Nikon S Fluor 100x 0.5-1.3 NA). We acquired 10 planes Zstack of 0.6 µm step around the intercellular bridge. The images shown are maximum Z-projection (MetaMorph software) of confocal spinning disk acquisition.

Statistics

We used GraphPad Prism software to produce all the graphs and statistical analysis. We used Student's *t*-test or the Kruskal Wallis test to determine the significance between groups, and the Pearson test to determine the significance of correlation for linear fits, as indicated in the figure legends. To study the migration of daughter cells (Fig. S5 and S11), we developed an automated analysis and tracking software using C++ with the OpenCV library and R (http://www.r-project.org/).

SUPPLEMENTARY FIGURE 1

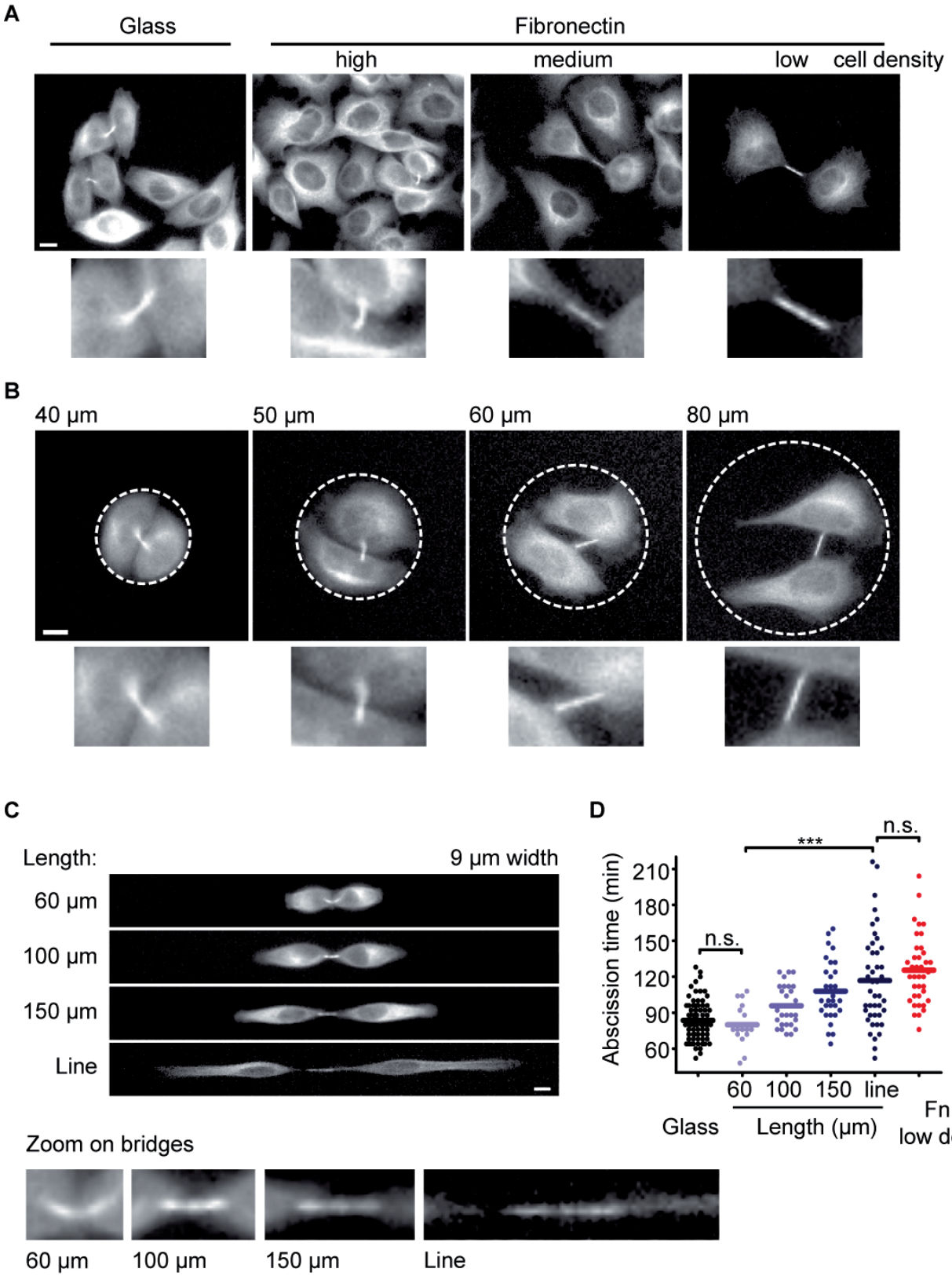


Fig. S1. Abscission is regulated in time by the spatial confinement of daughter cells. HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP and histone2B-mCherry (not shown) plated in different conditions of substrate coating and cell density (A), plated on disk-shaped micropatterns of different diameters (B), or on bar-shaped micropatterns of constant width (9 µm) and various lengths (60 µm, 100 µm, 150 µm, and line) (C). Scale bar 10 µm. Inserts are zooms of the intercellular bridge. (D) Quantification of abscission time in conditions described in (C). Each dot represents one daughter cell doublet and mean is shown as a bar. *n*=80 (non-treated glass), 18 (60 µm bar), 31 (100 µm bar), 33 (150 µm bar), 43 (line), 38 (fibronectin coating, low cell density). *** for *P* value < 0.0001 (Kruskal Wallis test), *n.s.* for not significant.

SUPPLEMENTARY FIGURE 2

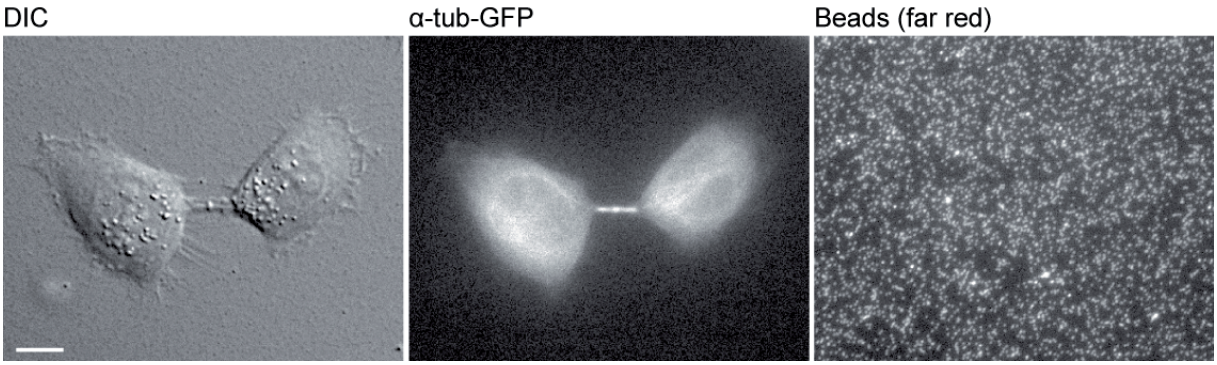


Fig. S2. Traction Force Microscopy. Images of HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP and histone2B-mCherry (not shown) plated on fibronectin-coated polyacrylamide gel with embedded fluorescent microbeads. Scale bar is 10 µm.

SUPPLEMENTARY FIGURE 3

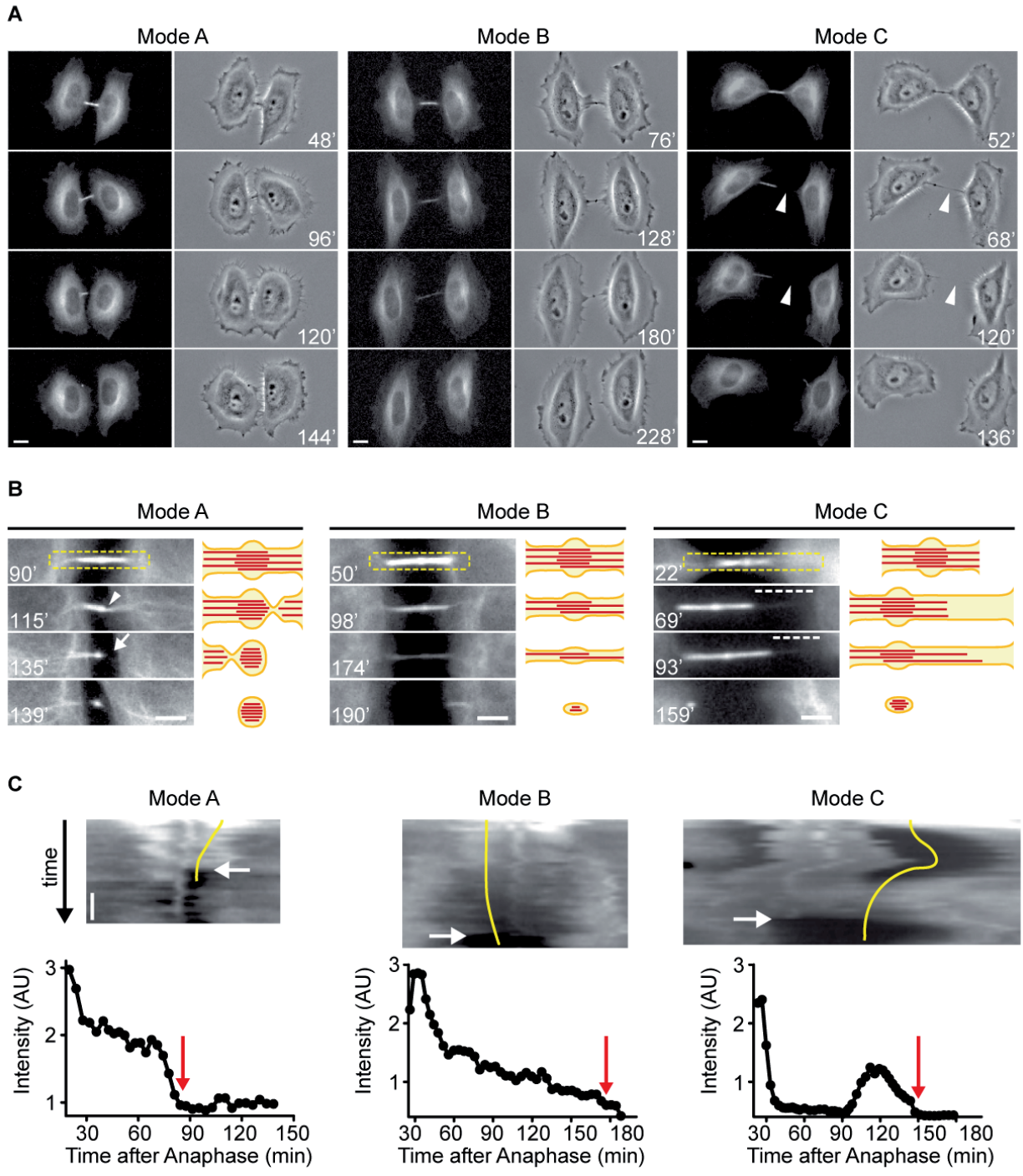


Fig. S3. Description of 3 different modes of abscission. (A) Time-lapse sequence of HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP and histone2B-mCherry (not shown), with phase contrast images. Arrowheads show the detachment of microtubule bundles from the cell cortex with an intact membrane bridge. Time is minutes after anaphase, scale bars 10 µm. (B) High-resolution images of the microtubule bundle visualized by α-tubulin-EGFP signal. The arrowhead shows the pinch of the microtubule bundle, and the arrow shows abscission. Dotted lines show a zone of the bridge with intact membrane but no microtubule bundle. Time is minutes after anaphase, scale bars 5 µm. Yellow boxes are regions for kymographs analysis presented in (C). (C) Top, Kymographs of the cells presented in (B), scale bar 30 min; bottom, temporal profile corresponding to the yellow line on the upper kymographs. Arrows (white and red) show the abscission.

SUPPLEMENTARY FIGURE 4

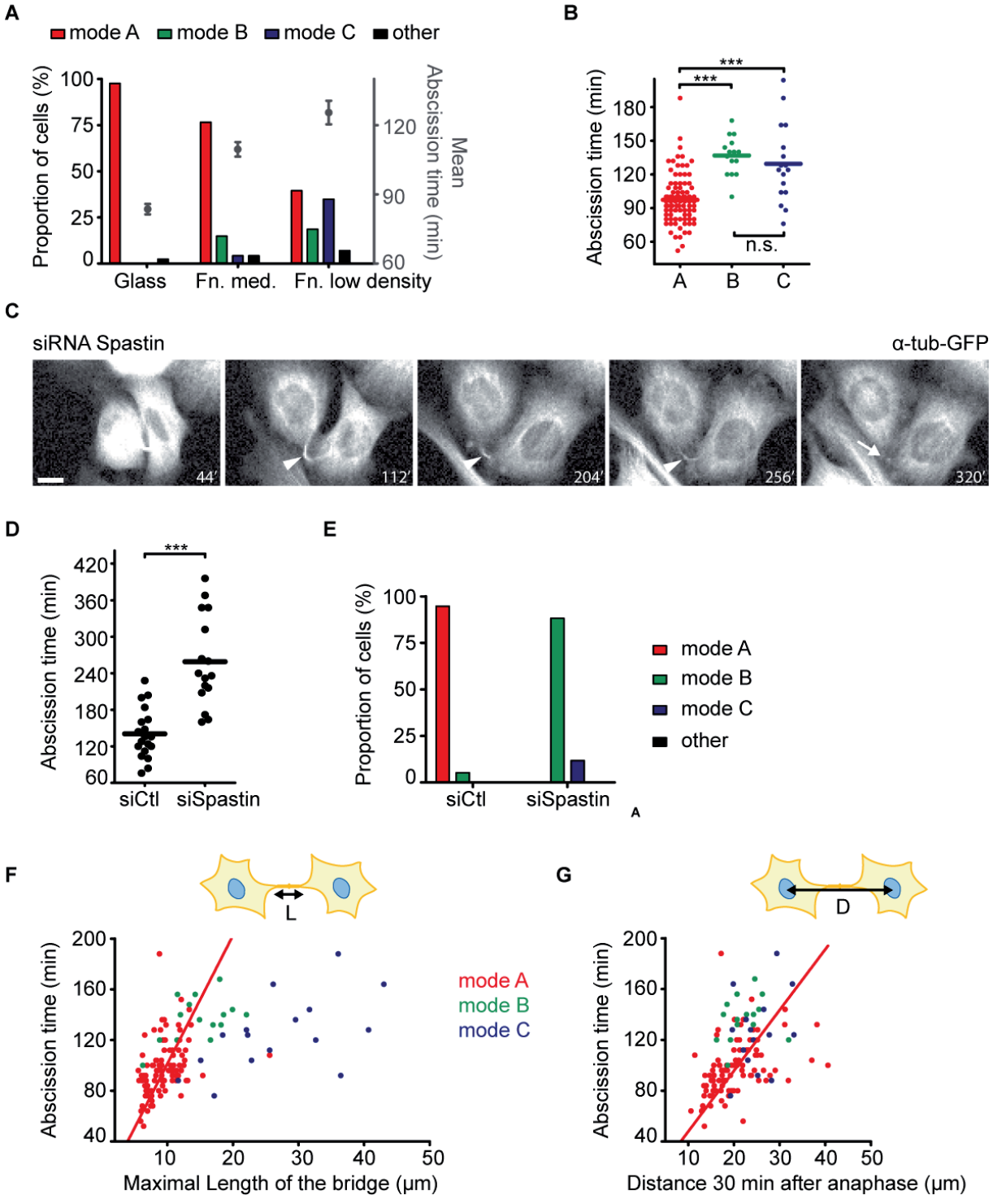


Fig. S4. Description of 3 different modes of abscission. (A) Percentage of cells showing mode A (red), mode B (green), mode C (blue) or other (black) abscission under different conditions of spatial confinement. *n*=42 (non-treated glass), *n*=47 (fibronection, medium cell density), *n*=43 (fibronectin coating, low density). In grey are shown mean abscission time and standard error for each condition (right axis, minutes). (B) Quantification of abscission time for the 3 abscission modes, all spatial confinement conditions pooled. *n*=94 (mode A), *n*=15 (mode B), *n*=17 (mode C). Mean is shown as a bar, *** for *P* value < 0.0001 (Kruskal Wallis test), *n.s.* for not significant. (C) Time-lapse sequence of siRNA-Spastin-treated cells visualized by α-tubulin-EGFP signal. Arrowheads show the slow disassembly of the microtubule bundle, arrow shows abscission. Time is minutes after anaphase, scale bars 10 µm. (D) Quantification of abscission time for siRNA Control (*n*=19) and siRNA Spastin treated cells (*n*=16). Cells are plated on fibronectin-coated glass at medium cell density for both conditions. Mean is shown as a bar, *** for *P* value < 0.0001 (Student's *t*-test). (E) Percentage of cells showing mode A (red), mode B (green), mode C (blue) or other (black) abscission in the previous two conditions. (F) Abscission time (min) as a function of the maximal length of the bridge (µm). *n*=125. (G) Abscission time (min) as a function of the distance (µm) between daughter cells 30 min after anaphase. *n*=126. For (F) and (G), each dot represents one daughter cell doublet, red lines are guidelines (linear fit passing through the origin), and color code is for abscission mode: mode A in red, mode B in green, mode C in blue.

SUPPLEMENTARY FIGURE 5

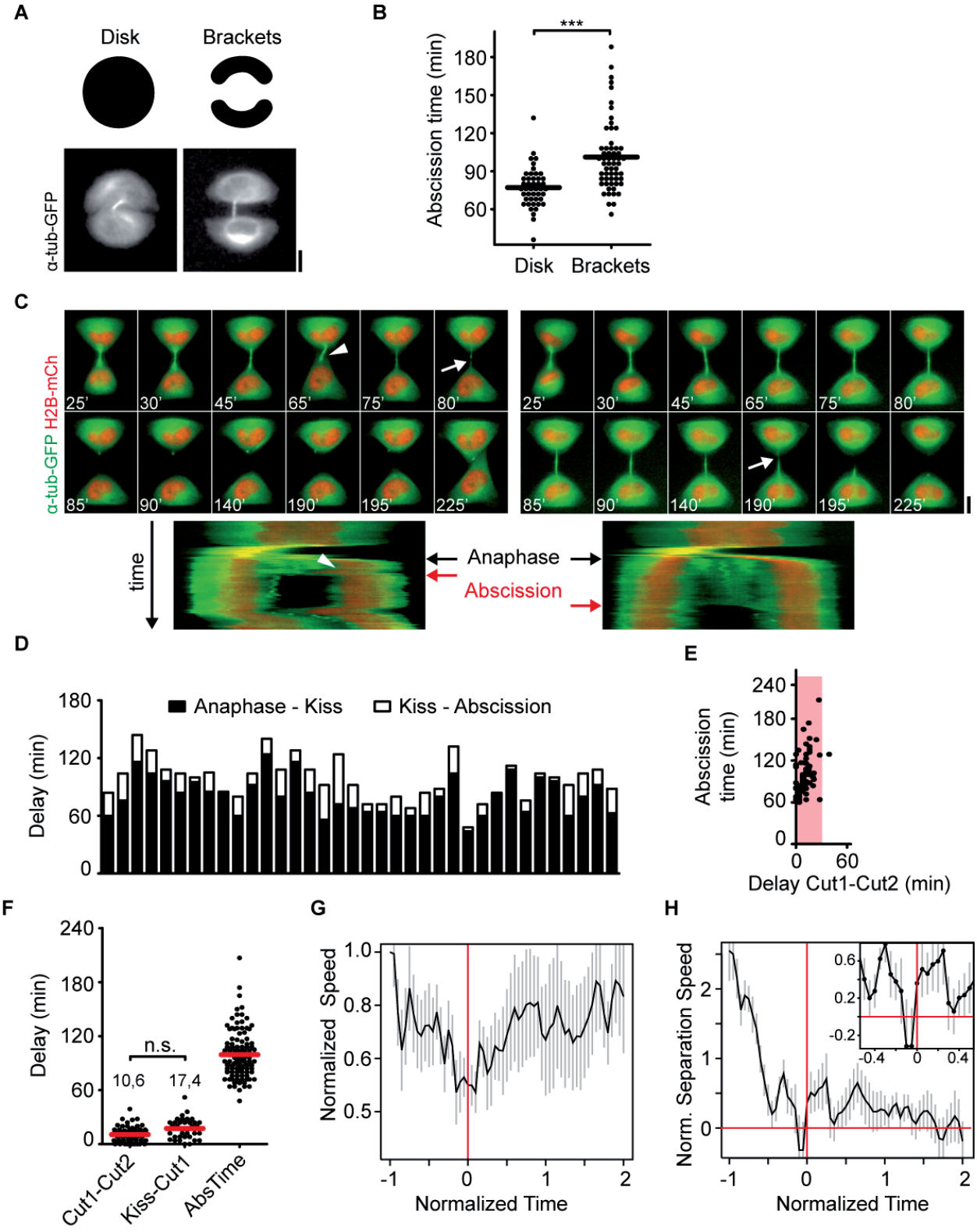


Fig. S5. Compression of the bridge or release of tension in the bridge is followed by abscission. (A) Representative images of HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP and histone2B-mCherry (not shown) plated on disk and bracket micropatterns of identical diameter. Scale bar 10 µm. (B) Quantification of abscission time for cells plated on disk (*n*=45) and bracket micropatterns (*n*=59). Mean is shown as a bar, *** for *P* value < 0.0001 (Student's *t*-test). (C) Time-lapse montage of HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP (green) and histone2B-mCherry (red) plated on twin patterns, with corresponding kymographs underneath. Scale bar 10 µm. On the left, one cell is going towards the other cell, undergoing a 'kiss' (arrow head). This is followed by abscission (arrow). On the right, the cells do not 'kiss' and abscission is delayed (arrow). (D) Quantification of the delay between the anaphase and 'kiss' (black) and between 'kiss' and abscission (white) for 36 cell doublets plated on various twin patterns. (E) Abscission time (min) as a function of the delay between the two successive cuts of the bridge: 'cut1' and 'cut2'. *n*=80 (F) Quantification of the delay between 'cut1' and 'cut2' (*n*=80), between 'kiss' and 'cut1' (*n*=36), and between anaphase and 'cut1' (abscission time, *n*=116). Means are shown as bars and specified for the lower ones, *n.s.* for not significant (Kruskal Wallis test). (G) Normalized instantaneous speed of daughter cells as a function of time. Speed is normalized to be equal to 1 at anaphase and 0.5 at abscission; time is normalized to be equal to -1 at anaphase and 0 at abscission (red line). (H) Separation speed of daughter cells as a function of time. Speed is obtained from the normalized distance between cells (D(t)-D(abs))/D(abs), where D(t) is the distance nucleus to nucleus between daughter cells at a time t, D(abs) is the distance between daughter cells at abscission) and time is normalized as in (G). For (G) and (H), *n*=35.

SUPPLEMENTARY FIGURE 6

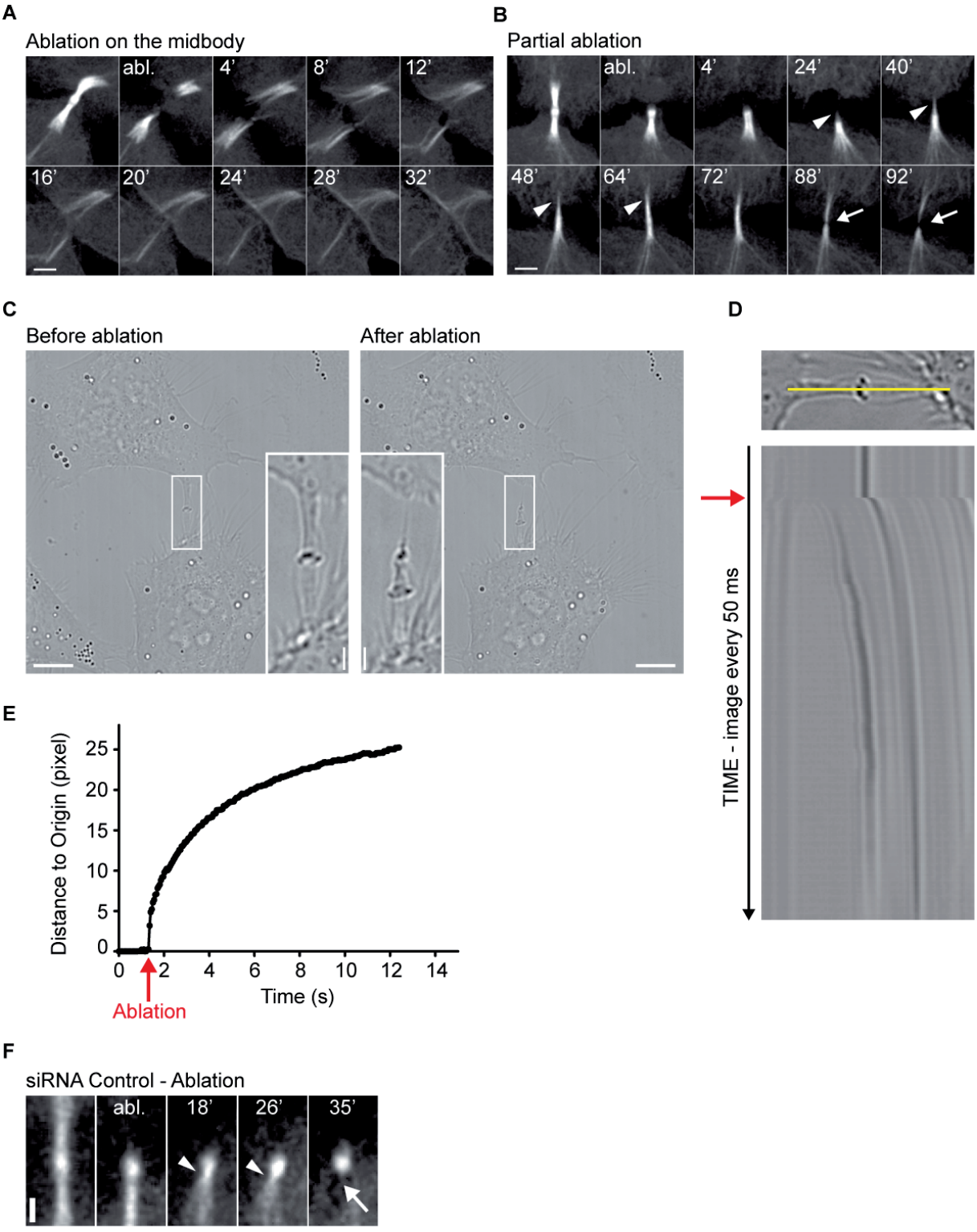


Fig. S6. Laser ablation on one side of the intercellular bridge releases the tension in the bridge. (A) Ablation performed on the central piece of the bridge (midbody). Scale bar 10 µm. (B) Partial ablation of the bridge: microtubules are cut but a thin membrane tube persists; microtubules are able to re-grow in the membrane tube and a full bridge is re-formed. Arrow heads show the re-growth of the microtubule bundle and arrows show abscission. Scale bar 10 µm. (C) Transmitted light images of a cell before and after ablation, scale bar 10 µm. Inserts are zooms on the intercellular bridge, scale bar 2 µm. (D) Kymograph analysis along the yellow line. (E) Automated tracking of the midbody to show the rapid displacement of this structure following the ablation: plot of the Distance to Origin (in pixel) as a function of time (in sec). For (D) and (E), red arrow shows the ablation. (F) Ablation performed on siRNA Control-treated HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP and histone2B-mCherry (not shown). The first image is before ablation, *abl.* is ablation, time is minutes after ablation, scale bar 2 µm. Arrow shows abscission and arrowheads show the pinch of the microtubule bundle.

SUPPLEMENTARY FIGURE 7

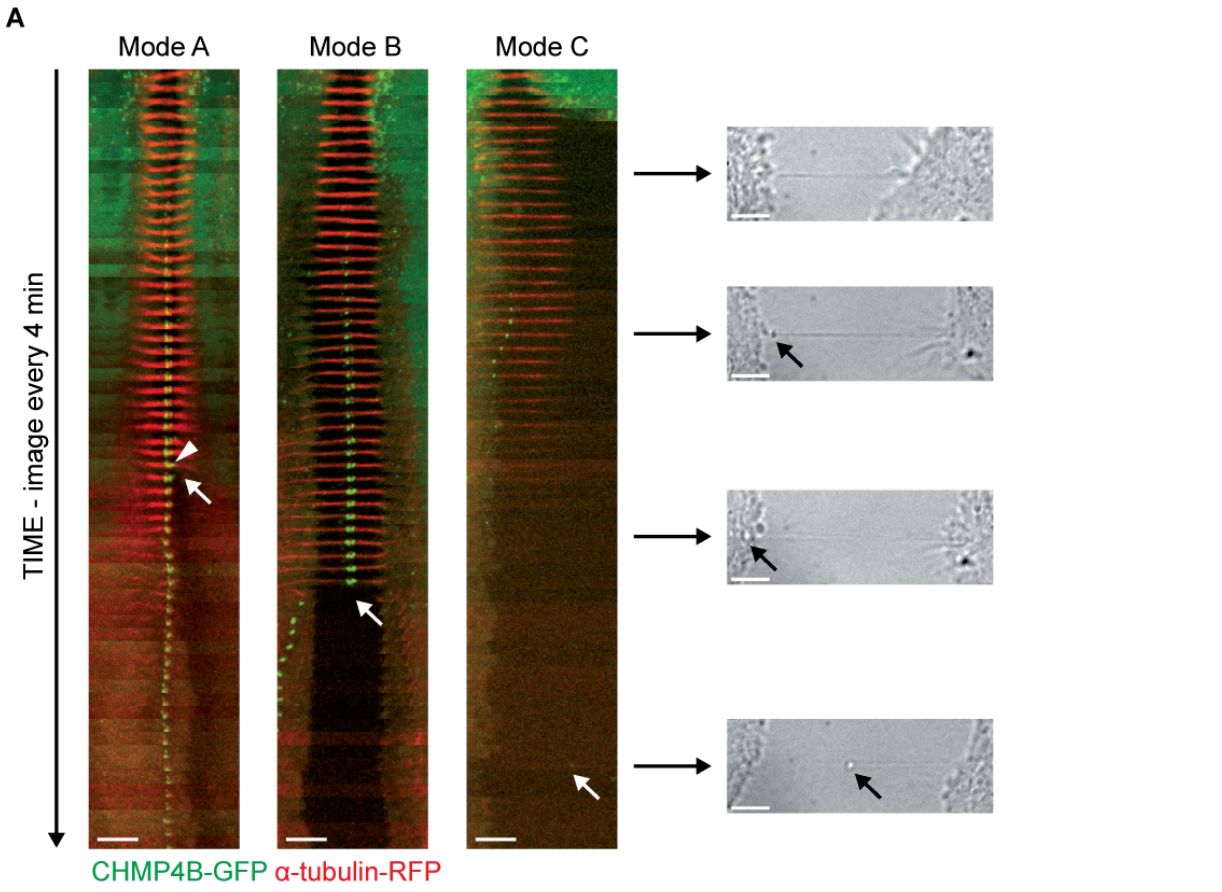


Fig. S7. CHMP4B-GFP localization and dynamics in different abscission modes and siRNA treatments. (A) Time-lapse sequence of HeLa Kyoto cells expressing CHMP4B-GFP (green) and α-tubulin-RFP (red). Few transmitted light images of mode C cell are presented on the right to show the integrity of the bridge. Arrow head shows CHMP4B conical structure formation before the abscission, white arrows show abscission, black arrows show the midbody in mode C cell. Scale bars 10 µm. (B) Time-lapse montage of siRNA Spastin-treated cells. Arrowheads show successive pinch of the microtubule bundle by CHMP4B then a release of this pinch. Time is minutes after the first image (bridge already formed), scale bar 5 µm. (C) Time-lapse montage of siRNA CHMP2A-treated cells. Arrow heads show massive accumulation of CHMP4B at the midbody, the CHMP4B cone is never formed and the abscission is completely inhibited. Time is minutes after the first image (bridge already formed), scale bar 5 µm. (D) Relative mRNA level of Spastin (left) or CHMP2A (right) in cells treated with siRNA Control, siRNA Spastin, or siRNA CHMP2A, measured by RT-qPCR.

SUPPLEMENTARY FIGURE 8

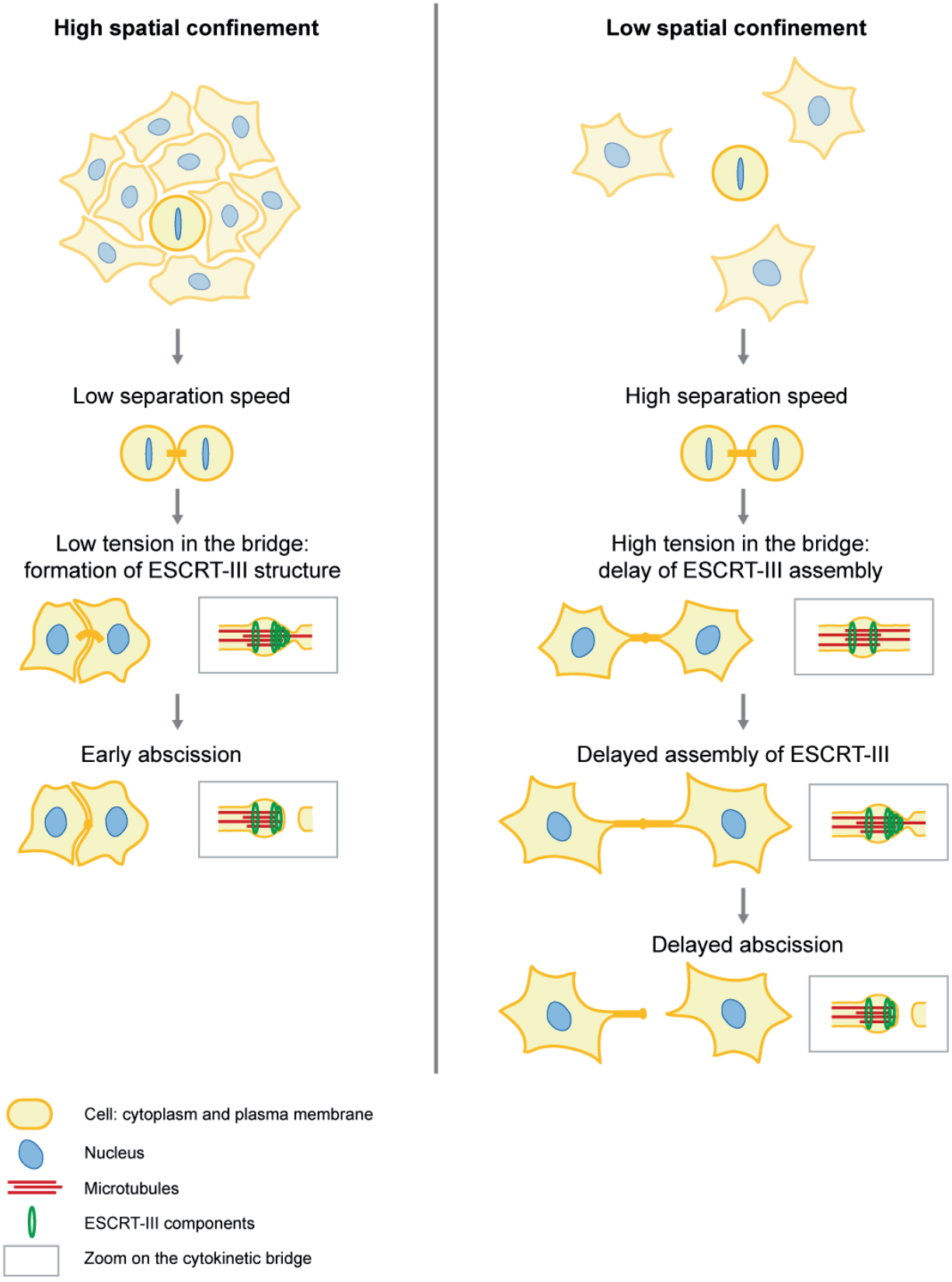


Fig. S8. General model for the regulation of abscission timing by the mechanical environment of the daughter cells. At high spatial confinement, daughter cells separate slowly, resulting in a low tension in the intercellular bridge. This allows a fast abscission with the formation of the ESCRT-III conical structure on the side of the midbody. On the contrary, at low spatial confinement, daughter cells separate rapidly, producing a higher force on the connecting bridge. This force delays the assembly of the ESCRT-III components, and thus delays the abscission.

SUPPLEMENTARY FIGURE 9

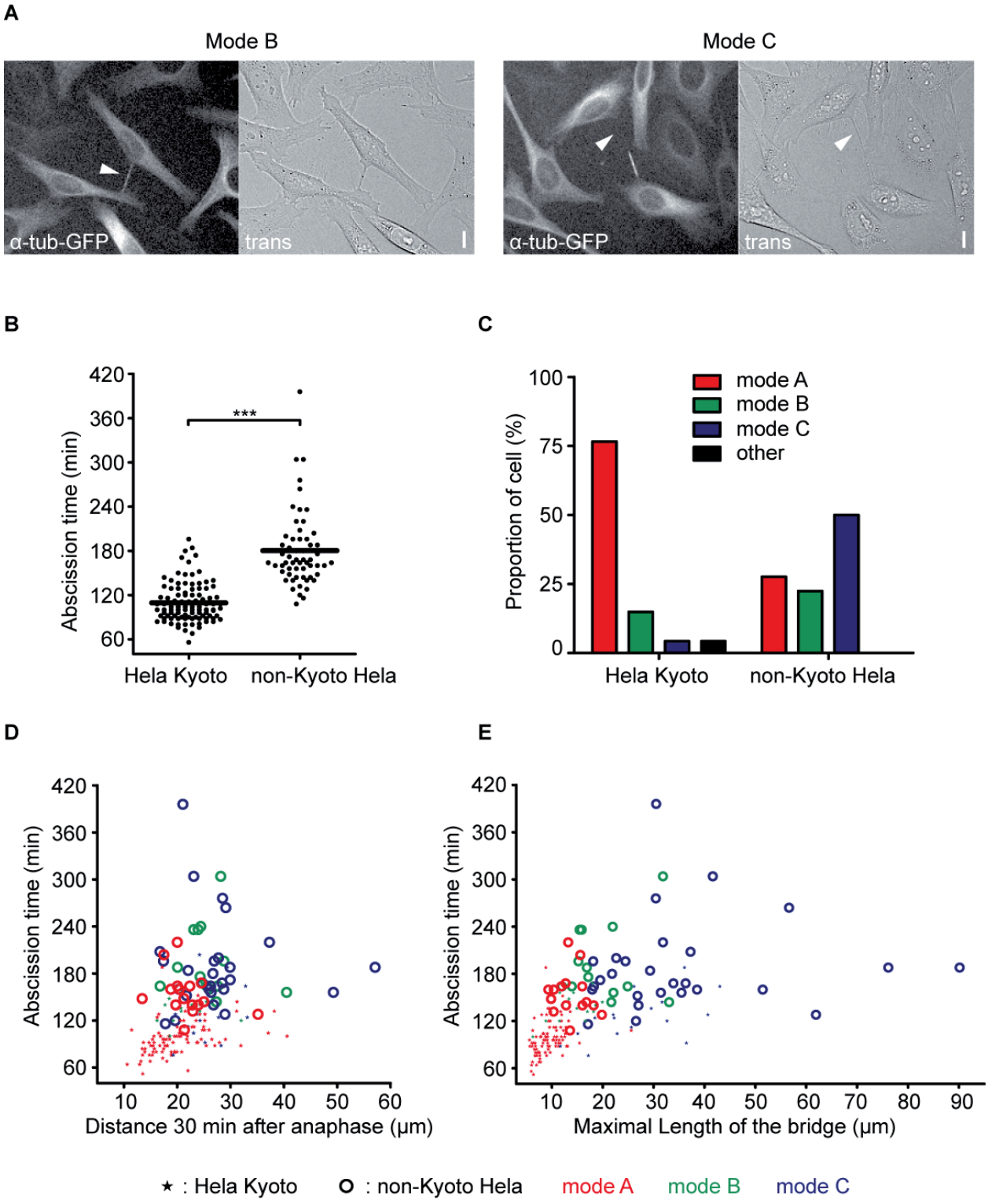


Fig. S9. Non-Kyoto HeLa cells show delayed abscission, more mode B and C abscission, and higher separation speed after division. (A) Representative images of the daughter cell morphology of non-Kyoto HeLa cells plated on fibronectin-coated glass at medium cell density (visualized by α-tubulin-EGFP signal and transmitted light, histone2B-mCherry is not shown). Arrowheads show a thin bridge on the left (mode B abscission type) and a detached microtubule bundle with intact membrane bridge on the right (mode C abscission type). Scale bars 10 µm. (B) Quantification of abscission time for HeLa Kyoto (*n*=99) and HeLa non-Kyoto (*n*=58) cells plated on fibronectin-coated glass at medium cell density. Mean is shown as a bar, *** for *P* value < 0.0001 (Student's *t*-test). (C) Percentage of cells showing mode A (red), mode B (green), mode C (blue) or other (black) abscission in the previous two conditions. (D) Abscission time (min) as a function of the distance (µm) between daughter cells 30 min after anaphase. (E) Abscission time (min) as a function of the maximal length of the bridge (µm). For (D) and (E), Hela Kyoto cells (*n*=125) are represented as small stars and HeLa non-Kyoto cells (*n*=56) by circles; color code is for abscission modes: mode A in red, mode B in green, mode C in blue.

SUPPLEMENTARY FIGURE 10

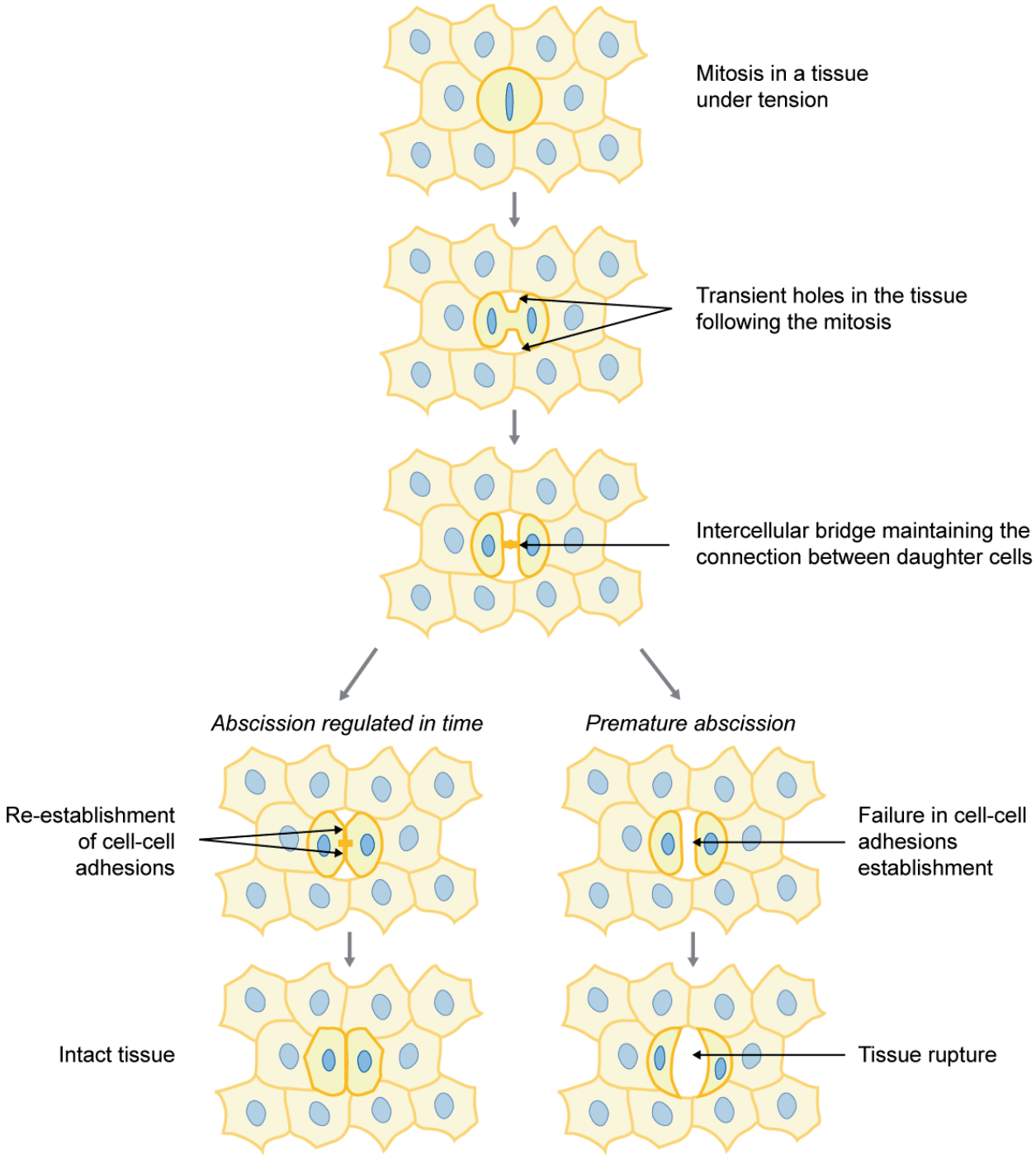


Fig. S10. Model for the function of the temporal regulation of the abscission by the mechanical environment of the daughter cells. In a tissue under tension, the daughter cells are pulled apart by their environment, introducing transient holes in the tissue. The maintenance of the intercellular bridge balances the pulling forces of the environment, allowing the establishment of the new adhesion between the daughter cells. Once the daughter cells are re-adhered, the resultant force in the bridge decreases and abscission occurs. If the abscission is premature, daughter cells are not able to establish the cell-cell adhesion and are pulled away by their environment, leading to a persistent hole in the tissue.

SUPPLEMENTARY FIGURE 11

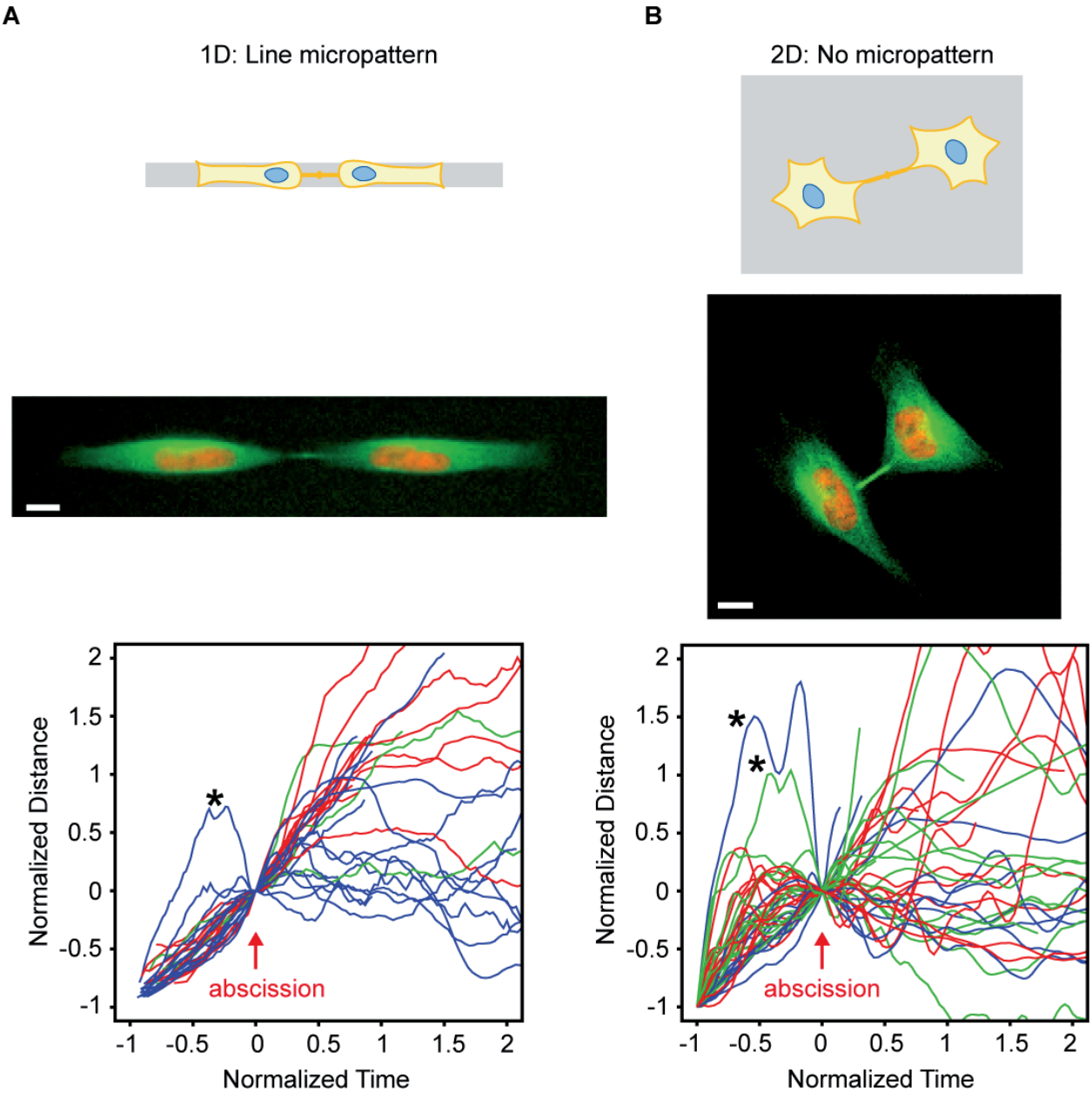


Fig. S11. Daughter cells show persistent separation before abscission, and random relative motion after abscission. Study performed on HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP (green) and histone2B-mCherry (red) plated on line micropattern (A) and on non-micropatterned fibronectin-coated surfaces (B). Scale bars 10 µm. The graphs represent the evolution in time of the distance between daughter cells. Normalized Distance=(D(t)-D(abs))/D(abs), Normalized Time=(t-t(abs))/(t(abs)-t(ana), where D(t) is the distance nucleus to nucleus between daughter cells at a time t, D(abs) is the distance between daughter cells at abscission, t(abs) is the time of abscission, and t(ana) the time of anaphase. Color code is for abscission modes: mode A in red, mode B in green, mode C in blue. Asterisks (*) show a minority of daughter cells which did not show persistent separation before abscission.

Movie S1. Time-lapse imaging of HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP plated on various substrates at various cell densities. Time in minutes, scale bar 10 µm.

Movie S2. Time-lapse imaging of HeLa Kyoto cells expressing α-tubulin-EGFP (green) and histone2B-mCherry (red) plated on disk-shaped micropatterns of different sizes. Time in minutes, 0 min is anaphase, scale bar 10 µm.

Movie S3. Acquisition for traction force microscopy experiments. For each cell, a movie of 4-min time-lapse is acquired from metaphase to abscission. Phase contrast (top left) and fluorescent microbead images (top right) are acquired at every timepoint, α-tubulin-EGFP images (bottom left) every 2 timepoints, and histone2B-mCherry images (bottom right) every 5 timepoints. At the end of the movie, the cell is detached to record the position of the gel without any stress. Time in minutes, 0 min is anaphase, scale bar 10 µm.

Movie S4. Force field (red arrows) is overlaid with phase contrast images. Time in minutes, 0 min is anaphase, scale bar 10 µm.

Movie S5. Three modes of abscission showed at low magnification with α-tubulin-EGFP signal and phase contrast images. Time in minutes, 0 min is anaphase, scale bar 10 µm.

Movie S6. Three modes of abscission showed at high magnification with α-tubulin-EGFP signal. Time in minutes, 0 min is anaphase, scale bar 10 µm.

Movie S7. Artificial release of tension in the bridge by laser ablation. Time in sec.ms, 00.000 is ablation, scale bar 10 µm.

Movie S8. Laser ablation experiments visualized by α-tubulin-EGFP images, bridge ablation and control ablation. Time in minutes, 0 min is ablation, scale bar 5 µm.

Movie S9. Ablation performed on siRNA Control, siRNA Spastin, and siRNA CHMP2A treated cells (visualized by α-tubulin-EGFP images). Time in minutes, 0 min is ablation, scale bar 5 µm.

Movie S10. Time-lapse imaging of HeLa Kyoto cells expressing CHMP4B-GFP (green) and α-tubulin-RFP (red) plated on fibronectin-coated substrate. Time in minutes, 0 min is anaphase, scale bar 5 µm.

Movie S11. Ablation performed on HeLa Kyoto cells expressing CHMP4B-GFP (green) and α-tubulin-RFP (red), at late stage (CHMP4B already recruited at the midbody) and at early stage (CHMP4B not yet recruited at the midbody). Each movie is followed by a zoom on the bridge. Time in minutes, 0 min is ablation, scale bar 5 µm.

3. Remarque

La première critique qui peut être faite par rapport à ce travail est que la **tension dans le pont n'a pas été mesurée de façon directe**. C'est d'ailleurs la principale remarque qui a été formulée par les referees lors de l'analyse du manuscrit de l'article. En effet, les expériences de Traction Force Microscopy n'ont pas permis d'accéder aux forces entre les cellules filles, trop faibles par rapport aux forces exercées sur le substrat. La démonstration du rôle de la tension comme facteur inhibant l'abscission repose essentiellement sur des corrélations entre le mouvement et le comportement des cellules filles (confinement spatial, vitesse de séparation, longueur du pont, contractilité) et des temps d'abscission plus ou moins longs. Bien que la relâche de tension dans le pont, soit naturelle par rapprochement des cellules filles soit artificielle par ablation, soit suivie de l'abscission, aucune mesure absolue de tension n'a été effectuée.

Actuellement, plusieurs approches sont en cours pour tenter de mesurer précisément la tension dans le pont. Tout d'abord, une **analyse du mouvement de relaxation du pont après ablation** au moyen d'une vidéomicroscopie très rapide (une image toutes les 5 ms environ). En effet, lors de l'ablation, le pont se relâche de façon très rapide, comme un élastique coupé par des ciseaux (Figure 6 C et D et Movie S7 de l'article). Il est alors possible de suivre la relaxation du pont en suivant le déplacement du midbody comme point de repère. En traçant la courbe de déplacement en fonction du temps (Figure 6 E de l'article), on observe une première phase de mouvement très rapide, correspondant essentiellement à la relâche de la tension du pont, et une seconde phase de mouvement plus lent, correspondant à la réorganisation des microtubules du pont. Le mouvement de relaxation est ensuite modélisé de manière à calculer la tension présente dans le pont au moment de l'ablation. Si cette approche est exploitable, il sera même envisageable de traiter les cellules avec différentes drogues, par exemple pour diminuer la tension de membrane ou dépolymériser les microtubules, et d'étudier l'effet sur la tension globale dans le pont.

Ensuite, des expériences de **Traction Force Microscopy couplées à l'ablation du pont** sont prévues afin de comparer la position du gel avant et après coupure du pont. Comme les mesures de TFM ne permettaient pas de mesurer la tension entre les cellules filles au cours de la cytocinèse, cette approche permettra peut-être de simplifier le calcul des forces exercées dans le pont. De plus, il devrait être possible d'effectuer en parallèle des films rapides afin d'observer la relaxation du pont lors de l'ablation, et d'ensuite analyser ces données avec le modèle décrit ci-dessus. Cela permettrait de calibrer précisément les mesures de tension par relaxation du pont suite à l'ablation, et par la suite d'utiliser uniquement la première approche, plus simple à mettre en œuvre que la TFM couplée à l'ablation.

Enfin, une **analyse des fluctuations du pont** au moyen de pièges optiques est réalisée en collaboration avec Timo Betz, chercheur dans l'unité de physique de l'Institut Curie (UMR 168). Cette technique permet de mesurer de manière non invasive certaines propriétés mécaniques d'objets biologiques, comme la tension, la viscosité, ou le module de flexion (Betz et al., 2009).

II. Une découverte inattendue : les ESCRT impliqués dans la réparation membranaire

1. Une observation fortuite

Au cours des expériences d'ablation sur le pont intercellulaire, j'ai eu l'occasion de faire une observation très étonnante. En utilisant la lignée CHMP4B-GFP, je me suis aperçue que l'ablation était souvent suivie de l'apparition d'un signal ponctuel au niveau de l'ablation, comme des vésicules qui apparaitraient fluorescentes suite à l'ablation. J'ai d'abord cru qu'il s'agissait d'un bruit aspécifique lié à la déstabilisation des ESCRT présents au niveau du pont. Pour vérifier l'origine de ce signal, j'ai donc réalisé des ablations contrôles dans des régions autre que le pont intercellulaire : au niveau du cytoplasme de cellules filles, ou sur des cellules en interphase. J'ai alors observé que l'ablation était systématiquement suivie du recrutement de vésicules fluorescentes au site de l'ablation, comme on peut le voir suite à des ablations réalisées au niveau du lamellipode d'une cellule en interphase (Figure 69 A). Comme je n'avais jamais observé de fluorescence parasite suite à l'ablation, le signal de fluorescence devait forcément provenir d'une accumulation de CHMP4B-GFP.

A ce stade, j'ai commencé à penser que **l'accumulation de CHMP4B-GFP pouvait être spécifiquement induite par l'ablation**, et que le recrutement de CHMP4B au site d'ablation pouvait être impliqué dans la **réparation de la cellule suite à la blessure de la membrane**. Lors des premières expériences d'ablation, la puissance du laser était volontairement assez forte afin d'amplifier la réponse cellulaire et de vérifier que le recrutement de CHM4B-GFP était bien induit par l'ablation. Par la suite, j'ai effectué des ablations ponctuelles et moins invasives, sur le bord de la cellule pour tenter d'endommager principalement la membrane plasmique et très peu le cytoplasme (Figure 69 B). L'accumulation de CHMP4B-GFP était également systématique après ces ablations ponctuelles : recrutement d'un petit groupe de vésicules autour du site d'ablation entre 10 et 30 secondes après l'ablation, ces vésicules pouvant rester assez longtemps associées au site d'ablation (de l'ordre de l'heure) avant de finalement se dissiper dans la cellule (Film 12).

Bien qu'il n'ait jamais été montré ou même suggéré que les ESCRT pourraient être impliqués dans les processus de réparation membranaire, ces expériences montraient clairement un recrutement massif et systématique de CHMP4B au niveau de l'endommagement de la membrane par ablation laser. Ainsi, cette observation étonnante, nécessitant tout de même des contrôles adéquats pour écarter un effet d'artefact, ouvrait la voie vers un sujet tout à fait nouveau, donc très intéressant.

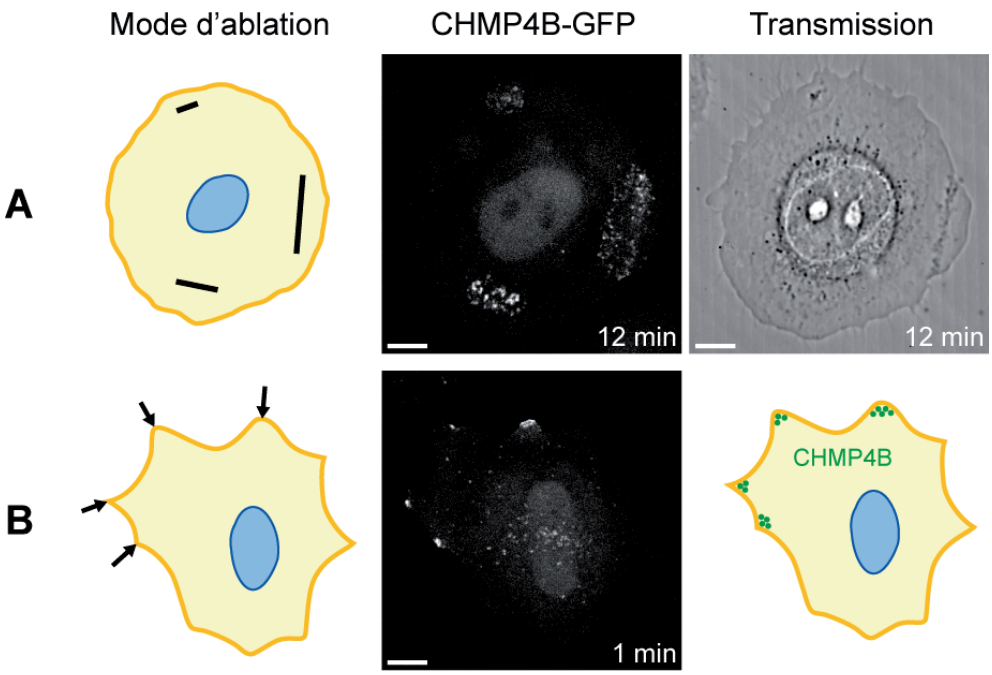


Figure 69 : Recrutement de vésicules CHMP4B-GFP positives suite à un endommagement cellulaire
A) Ablations laser au niveau du lamellipode (selon les lignes noires représentées sur le schéma). B) Ablations ponctuelles au niveau de la membrane plasmique (flèches). Echelles 10 µm. Temps en minutes après l'ablation.

2. La réparation membranaire

Ce paragraphe a pour objectif de donner un bref aperçu de la réparation membranaire, des mécanismes connus à ce jour, et de l'importance des processus de réparation dans l'homéostasie cellulaire et plus généralement de l'organisme entier. Il ne s'agit en aucun cas de détailler de manière exhaustive les connaissances sur la réparation membranaire, ce qui demanderait une introduction complète à ce sujet, tout à fait hors de propos.

Les cellules sont naturellement soumises à des **contraintes mécaniques** pouvant engendrer des **ruptures au niveau de la membrane plasmique**. Par exemple, les cellules des muscles, des os, ou des épithéliums intestinaux sont soumises à de fortes contraintes et sont assujetties à de fréquentes ruptures de la membrane. La réparation de ces endommagements est alors essentielle pour éviter d'une part la perte définitive de cellules irremplaçables, comme les cardiomyocytes ou les neurones, et d'autre part un remplacement continuel d'un nombre trop important de cellules. Ainsi, un défaut de réparation de la membrane plasmique peut conduire à différents types de maladie en fonction du tissu affecté. Notamment, certaines dystrophies musculaires sont dues à un défaut de réparation membranaire provenant de la mutation de la protéine Dysferline (Bansal & Campbell, 2004). D'autres endommagements de la membrane peuvent être causés par des protéines formant des **pores dans la membrane plasmique**, les « pore forming proteins », comme certaines toxines bactériennes. Selon le type de protéine, les pores présentent une taille comprise entre 2 et 50 nm.

La principale conséquence d'une perforation de la membrane plasmique est le changement de la composition cytosolique en ions, notamment une baisse de la concentration en potassium et une hausse de concentration en calcium, et une perte du potentiel de membrane. Dans le cas d'une perforation importante, comme lors d'un stress mécanique, la réparation doit être très rapide car **l'influx de calcium** perturbe fortement l'homéostasie cellulaire et peut conduire à la mort de la cellule en quelques secondes.

Si l'influx de calcium est nocif à la cellule, il est aussi initiateur des réponses cellulaires activant les mécanismes de réparation membranaire. La rapidité de la réponse cellulaire ainsi que les mécanismes de réparation dépendent de l'importance de l'influx de calcium, lui-même directement lié à la taille du trou dans la membrane. Pour des pores de 20 à 50 nm, la réparation est assez rapide, de l'ordre de l'heure, alors que pour des pores de 2 nm, l'influx de calcium est très faible voir inexistant et la réparation peut prendre plus de 6h. Dans le cas des pores, la réparation s'effectue par **endocytose**, le pore étant retiré de la membrane plasmique (Bischofberger et al., 2009).

Suite à une sollicitation mécanique, la blessure est généralement de taille importante, supérieure à 1 µm de diamètre. L'influx de calcium est alors massif et la réparation très rapide, de l'ordre de la seconde. Deux mécanismes sont principalement décrits (McNeil & Kirchhausen, 2005). Le premier repose sur une **exocytose** importante qui a pour effet de relâcher la tension de membrane, facilitant ainsi sa réparation naturelle. Le second repose sur une fusion de nombreuses vésicules entre-elles pour former un **« patch » vésiculaire** au niveau de la zone endommagée. Le patch fusionne ensuite avec la membrane pour combler et réparer le trou. Au niveau moléculaire, plusieurs protéines sont sensibles à l'entrée de calcium et permettent d'initier la réponse cellulaire de réparation. Parmi celles-ci, on peut citer les Synaptogamines, bien que leur rôle exact soit encore sujet à débat (McNeil & Kirchhausen, 2005), la famille des Ferlines dont la Dysferline fait partie (Bansal & Campbell, 2004), et les Annexines (Bouter et al., 2011).

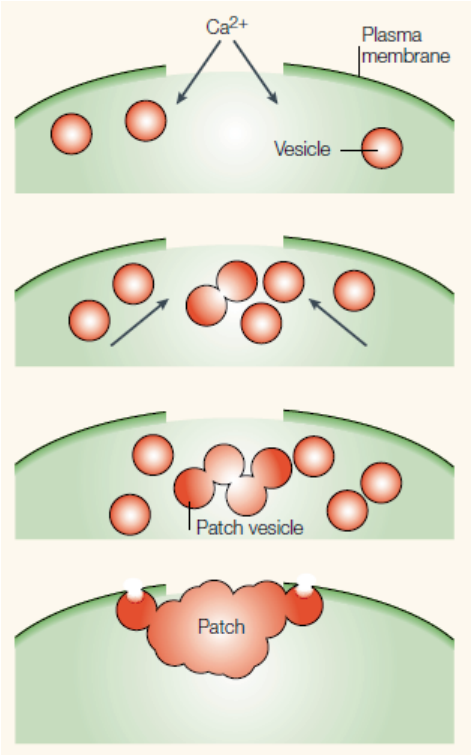


Figure 70 : Modèle de réparation par "patch" vésiculaire
L'influx massif de calcium induit la fusion de vésicules entre-elles, formant une plaque membranaire au niveau de la blessure, ou « patch ». La réparation s'effectue ensuite par fusion de la plaque avec la membrane plasmique. D'après (McNeil & Kirchhausen, 2005)

3. Un projet à part entière

Ces observations préliminaires de recrutement de CHMP4B à la suite d'une ablation laser ont donné naissance à un **projet de recherche** mené par ma collègue Ana Jimenez, doctorante dans l'équipe de Franck Perez à l'UMR 144 de l'Institut Curie. Ce projet a même constitué la seconde partie de sa thèse et la préparation d'un article complet est en cours. Entre autres, elle a pu mettre en évidence que les autres membres de la famille ESCRT-III sont également recrutés aux sites de réparation de la membrane plasmique suite à un endommagement : **CHMP2**, **CHMP3**, mais aussi **Vps4**, l'ATPase qui désassemble les structures d'ESCRT-III et permet leur dynamique. Elle a également vérifié qu'une blessure de la membrane par d'autres moyens que l'ablation au laser UV induisait bien le recrutement des ESCRT-III : ablation au moyen d'un laser 2-photons, utilisation de **composés chimiques** formant des pores dans la membrane (Digitonine et Saponine), et blessure de la membrane au moyen d'une **micro-aiguille de micro-injection**.

L'utilisation de **iodure de propidium** (PI en anglais), un intercalant fluorescent des acides nucléiques, a ensuite permis de caractériser le temps de fermeture du trou formé par l'ablation. En effet, la cellule est imperméable au PI et le PI n'est pas fluorescent lorsqu'il n'est pas associé aux acides nucléiques. Lors de l'ouverture du trou par ablation, le PI entre

dans la cellule, se complexe avec les acides nucléiques de la cellule et fluoresce. Ainsi, il est possible de suivre l'entrée de PI par suivi de l'augmentation de la fluorescence, et d'observer un plateau de fluorescence lorsque le trou est refermé et que le PI ne pénètre plus dans la cellule (Figure 71 A). Cette approche permet non seulement un suivi quantitatif du processus de réparation membranaire, mais aussi d'accéder à certaines caractéristiques, comme le temps de fermeture du trou ou la taille du trou, en appliquant aux mesures un modèle physique basé sur la diffusion de la molécule fluorescente à travers le trou.

D'autres expériences ont montré que le taux de **mortalité cellulaire** à la suite d'une ablation ponctuelle de la membrane était quasiment doublé lorsque CHMP4 était déplété par siRNA ou lors de l'expression d'un mutant de Vps4 à effet dominant négatif, par rapport aux contrôles respectifs de siRNA contrôle ou expression de Vps4 fonctionnel. Ce résultat suggère donc que la fonction des ESCRT-III pourrait être essentielle à la réparation correcte de la membrane, et pourrait contribuer à la survie cellulaire suite à une blessure. Enfin, des expériences en microscopie corrélative d'ablation et suivit du recrutement de CHMP4B-GFP en fluorescence puis d'images en microscopie électronique à balayage ont permis de mettre en évidence la formation de **bourgeons membranaires** au niveau des sites d'ablation (Figure 71 B). Le modèle proposé est alors que les ESCRT-III seraient recrutés au niveau des blessures de la membrane afin d'exclure par bourgeonnement les parties de la membrane qui ont été endommagées.

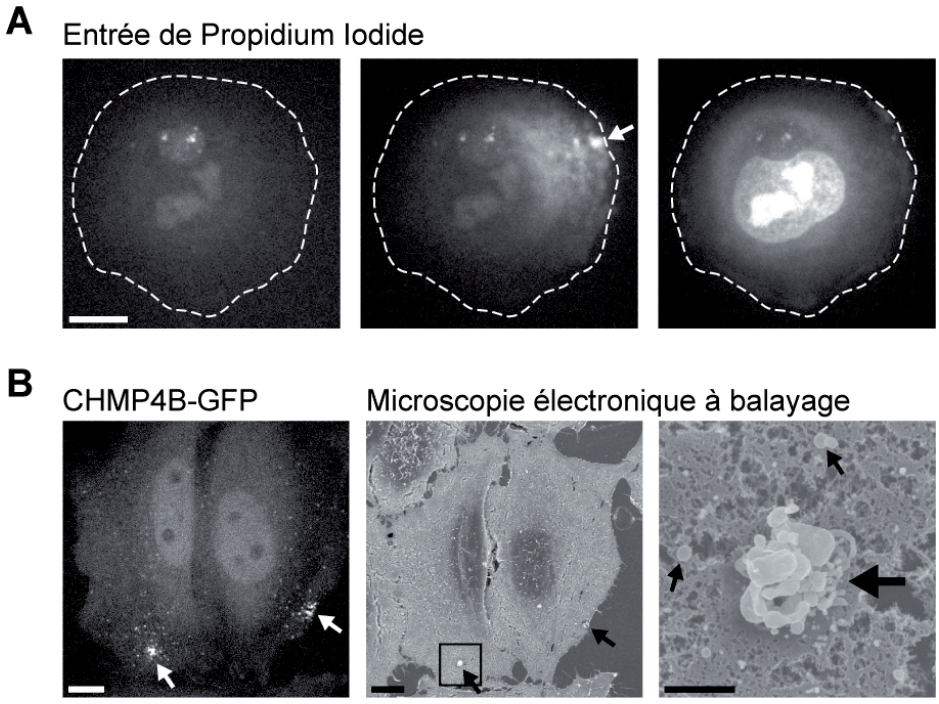


Figure 71 : Observation dynamique et quantitative de la réparation membranaire et microscopie corrélative
A) Entrée de Propidium Iodide suite à un endommagement membranaire par ablation laser (au niveau de la flèche blanche). Le contour de la cellule est représenté par une ligne en pointillés. Images de gauche à droite : avant ablation ; quelques secondes après ablation ; après fermeture du trou. Echelle 10 µm. B) Imagerie corrélative. A gauche, fluorescence de CHMP4B-GFP après ablation laser (au niveau des deux flèches blanches), échelle 10 µm. Au milieu et à droite, images en microscopie électronique à balayage des cellules présentées à gauche. Au milieu, grossissement x800, échelle 10 µm. A droite, grossissement x16000, échelle 1 µm, zoom de la zone encadrée sur l'image du milieu ; les flèches indiquent les bourgeons membranaires. Expériences réalisées par Ana Jimenez.

En conclusion, cette seconde partie des résultats illustre la naissance d'un projet à part entière à partir d'une simple observation effectuée lors d'expériences dont le but était tout à fait autre. L'observation critique, l'identification de l'intérêt scientifique, et la volonté d'étudier un phénomène complètement nouveau ont permis de mener à bien ce projet. Il a également été essentiel de trouver quelqu'un qui su non seulement voir l'intérêt du projet mais aussi qui a pu s'impliquer à 100 % dans le sujet. Merci Ana.

Discussion

Dans la dernière partie de ce mémoire, je propose une réflexion sur les travaux de mise en évidence et de caractérisation de la régulation dans le temps de l'abscission par le comportement des cellules filles, en particulier par les forces exercées au niveau du pont intercellulaire. J'aborde les mécanismes potentiels de cette régulation, les fonctions qu'une telle régulation pourrait avoir au niveau cellulaire et multicellulaire, et finalement je propose une mise en perspective de ces travaux de recherche. J'accompagne les différentes hypothèses de pistes concrètes lorsque certains résultats préliminaires le permettent.

I. Mécanismes potentiels de la régulation dans le temps de l'abscission par le comportement des cellules filles

1. Maturation du pont intercellulaire

Dans l'introduction, j'ai présenté un modèle mixte d'abscission selon lequel une phase de maturation serait nécessaire à la préparation du pont en vue de l'abscission. Il est intrigant de remarquer que, même si le temps d'abscission varie beaucoup d'une lignée cellulaire à une autre (et parfois même au sein d'une même lignée cellulaire), il est rarement inférieur à une heure. L'inhibition de AuroraB accélère légèrement l'abscission, mais 40 à 50 minutes sont tout de même nécessaires à la cellule pour déclencher l'abscission après la formation du pont (Steigemann et al., 2009). On peut alors penser que ce temps minimum correspond à la phase de maturation nécessaire à l'abscission, phase incompressible pendant laquelle l'abscission n'est pas encore possible puisque la machinerie adéquate n'est pas encore fonctionnelle. L'observation des ESCRT au niveau du pont illustre bien cette notion de maturité puisqu'ils sont recrutés progressivement au midbody. En revanche, il est possible que cette phase de maturation soit nécessaire à l'abscission, mais pas suffisante. On pourrait proposer un modèle avec une première phase de maturation du pont, puis une seconde phase pendant laquelle le pont mature serait prêt à être coupé, mais attendrait un **signal déclencheur** ou une **levée d'inhibition de l'abscission**. La tension dans le pont pourrait alors être à l'origine de la régulation de la seconde phase : une forte tension inhiberait l'abscission, alors qu'une relâche de tension constituerait un signal déclencheur. Dans ce cas, la variabilité du temps d'abscission serait expliquée par la durée de la seconde phase en attente du déclenchement de l'abscission : s'il n'y a pas de tension dans le pont, l'abscission a lieu systématiquement à la fin de la maturation du pont, de façon reproductible ; si au contraire le pont est sous tension, à la fin de la phase de maturation, il y a une phase d'attente où l'abscission est inhibée par la tension dans le pont, puis dès qu'une relâche de

tension autorise l'abscission, le pont est coupé. Les expériences d'ablation sont cohérentes avec cette hypothèse puisque l'ablation du pont n'induit l'abscission que lorsque CHMP4B est déjà recruté au midbody, suggérant qu'avant cet état de maturité du pont, la machinerie de l'abscission n'est pas encore fonctionnelle au midbody et l'abscission ne peut pas avoir lieu même si une relâche de tension le permet (Figure 4 B et C de l'article). A l'inverse, si le pont est déjà mature au moment de l'ablation (CHMP4B déjà recruté au midbody), une simple relâche de tension induit l'abscission. On peut également penser que la tension dans le pont affecte aussi la phase de maturation en modifiant la structure du pont. Le routage des composants essentiels à l'abscission vers le midbody *via* les microtubules pourrait prendre plus de temps lorsque le pont est plus long du fait d'une distance plus importante à parcourir. On observe en effet une corrélation entre un retard d'abscission et un retard de recrutement de CHMP4B au midbody (Figure 4G de l'article).

Au niveau moléculaire, on peut proposer que la maturation du pont soit définie par un **seuil critique** d'accumulation de composants au midbody (par exemple des ESCRT-III), l'abscission n'étant possible qu'à partir d'un certain seuil minimum. Une étude quantitative du recrutement des ESCRT-III au midbody permettrait de confirmer cette hypothèse. Alternativement, la **densité locale** de ces composants pourrait réguler l'abscission, une densité locale seuil étant plus difficile à atteindre lorsque le pont est sous tension, donc nécessitant plus de temps. Selon cette seconde hypothèse, la relâche de tension dans le pont faisant suite à l'ablation augmenterait brutalement la densité locale des ESCRT-III, induisant la formation de l'hélice finale d'ESCRT-III suivie de l'abscission.

2. Structure des microtubules du pont

Au début de ma thèse je me suis intéressée à l'organisation des microtubules dans le pont intercellulaire. L'étude de la localisation de la protéine EB3 (de la famille de EB1, protéine des bouts « plus » associée au microtubule lors de sa polymérisation) permet d'observer la dynamique de polymérisation des microtubules. Même si les microtubules du pont sont assez stables (acétylés, polyglutamylés, résistants aux drogues), ils présentent une dynamique intense sur les côtés du midbody (Figure 72A). Des résultats préliminaires montrent que la localisation de EB3 évolue au cours du temps (Figure 72B) : en cytocinèse précoce, EB3 est localisé en deux bandes très nettes sur les côtés du midbody (Film 16), plus tard il y a formation d'un petit cône de part et d'autre du midbody dans lequel les microtubules polymérisent activement (Film 17), puis en cytocinèse tardive les cônes semblent s'allonger, surtout sur les ponts très longs (Film 18). Des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) ont confirmé cette activité de polymérisation intense sur les bords du midbody (Figure 72C). Dans cette expérience, la fluorescence de la tubuline est « éteinte » sur la moitié du pont. Seule une petite bande localisée sur le côté du midbody retrouve rapidement de la fluorescence, signe que la tubuline est dynamique

uniquement à ce niveau, le reste étant stable et ne retrouvant pas de fluorescence (Film 19 et Film 20).

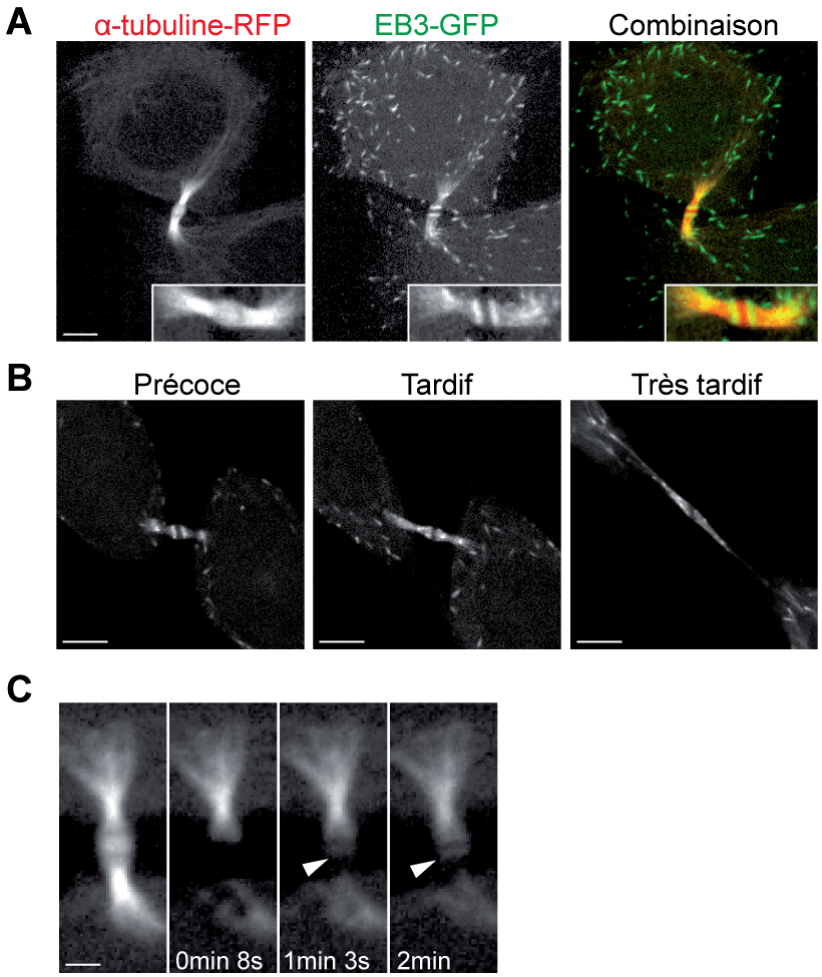


Figure 72 : Dynamique des microtubules du pont intercellulaire
A) Localisation de EB3-GFP dans une lignée stable de cellules HeLa exprimant à la fois EB3-GFP et α-tubuline-RFP. B) Localisation de EB3 au pont intercellulaire à différentes phases de la cytocinèse. C) Expérience de FRAP sur des cellules HeLa α-tubuline-GFP et H2B-mCherry. La première image est avant l'illumination laser effectuée à 0 min. Les flèches indiquent la récupération de fluorescence en fine bande sur le côté du midbody. Pour A) et B) échelles 5µm, pour C) échelle 2 µm.

Sur la base de ces observations, on peut proposer un modèle d'organisation des microtubules du pont selon lequel les microtubules provenant de chacune des deux cellules filles se chevauchent au midbody, traversent le midbody et ne laissent dépasser du midbody que leur bouts « plus », formant une petite zone où les microtubules ont une activité de polymérisation. Cette organisation des microtubules du pont a été confirmée par des études ultrastructurales ultérieures (Elad et al., 2011; Schiel et al., 2011). Dans ce modèle, trois zones sont distinguées (Figure 73) : i) une zone centrale où les microtubules sont très stables, et où les moteurs moléculaires et PRC1 assurent une forte cohésion des microtubules ; ii) de chaque côté du midbody, une zone d'activité intense de polymérisation des microtubules ; iii) à l'extérieur de cette zone de polymérisation, une zone où les

microtubules sont déstabilisés ou coupés, permettant de restreindre la polymérisation des microtubules aux deux bandes fines de part et d'autre du midbody. Cette zone de déstabilisation pourrait contenir des enzymes de coupure des microtubules ou des facteurs dépolymérisants associés aux bouts « plus » des microtubules.

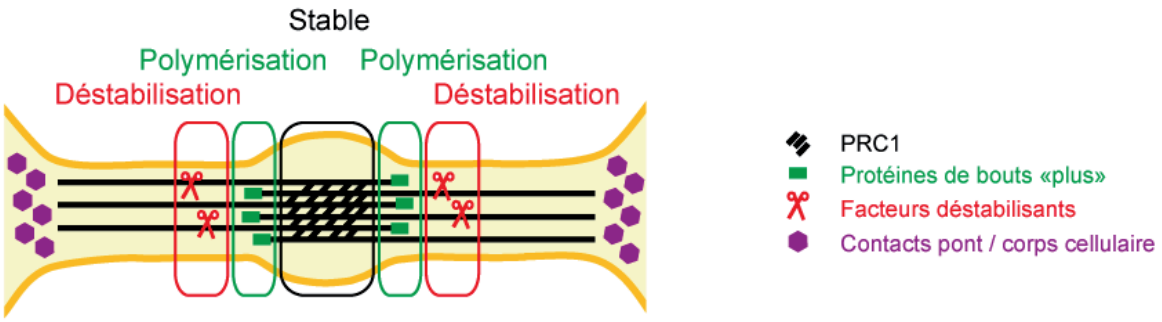


Figure 73 : Modèle de l'organisation des microtubules du pont

En se basant sur ce modèle, on peut proposer un mécanisme de régulation de l'abscission par la tension dans le pont qui modifierait l'organisation des microtubules du pont. Lorsque le pont est sous tension, les bouts « plus » des microtubules pourraient rentrer dans la zone stable et seraient ainsi protégés de toute dépolymérisation ou coupure, empêchant ainsi l'abscission et entraînant l'allongement des microtubules du pont. Lors d'une relâche de tension dans le pont, les microtubules pourraient sortir de cette zone centrale protectrice, ils seraient alors brutalement exposés aux enzymes de coupure et/ou aux facteurs déstabilisants, ce qui induirait la coupure des microtubules et faciliterait l'abscission. Pour tester cette hypothèse, on peut envisager de couper le pont par ablation et de suivre l'organisation des microtubules, par exemple en observant EB3. Si à la suite de l'ablation, la zone de EB3 s'étend depuis le midbody vers la zone d'abscission (Figure 74), cela confirmerait qu'une réorganisation des microtubules du pont pourrait déclencher l'abscission suite à une relâche de tension dans le pont.

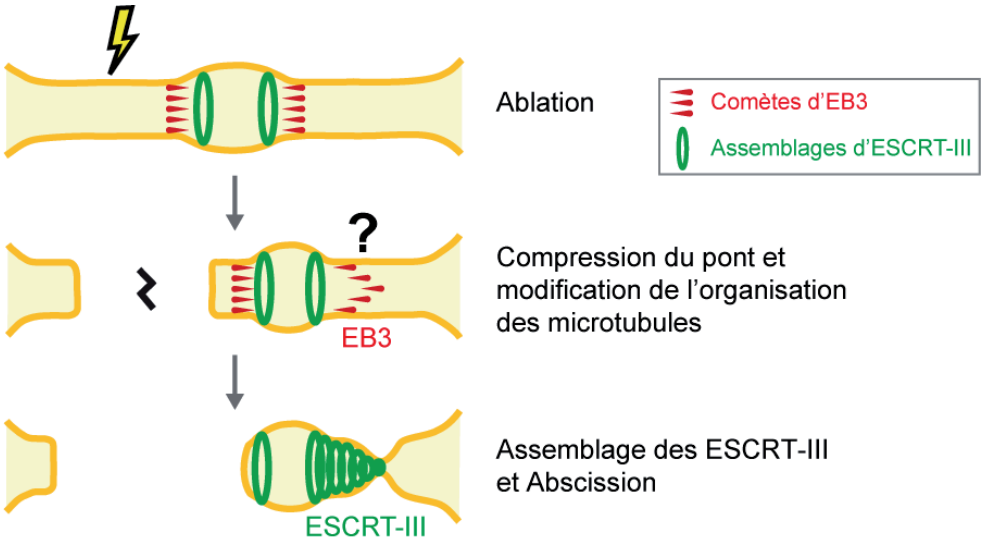


Figure 74 : Suivi de l'organisation des microtubules lors des expériences d'ablation

Pour finir, quelques points restent à éclaircir pour compléter ce modèle d'organisation des microtubules du pont :

- Comment sont définies les zones de polymérisation et de déstabilisation ?
- Comment les microtubules du pont sont-ils ancrés au niveau des corps cellulaires des cellules filles ? Est-ce que les septines par exemple pourraient jouer ce rôle d'ancrage ?
- Comment les microtubules s'adaptent-il à la longueur du pont ?
- Comment les différents constituants du midbody et de la machinerie de l'abscission sont-ils recrutés à des localisations très précises au sein du midbody, par exemple au centre ou sur les côtés du midbody ? Notamment, un article récent (Hu et al., 2012) décrit une architecture très complexe du midbody en terme de localisation de ses composants, sans pour autant proposer une explication de l'origine de ces localisations.

3. CHMP4C et AuroraB

Récemment, une étude a montré l'implication de la sous-unité ESCRT-III CHMP4C dans l'inhibition de l'abscission en cas de pont d'ADN (J. G. Carlton, A. Caballe, et al., 2012). Dans ce modèle, AuroraB, activée par la présence d'ADN dans le pont intercellulaire, phosphoryle CHMP4C qui se relocalise alors des côtés du midbody vers le centre du midbody (Figure 75A), ceci inhibant l'abscission par un mécanisme encore inconnu. Dans cette étude, les auteurs montrent également que la déplétion par siRNA de CHMP4C accélère l'abscission, et ce même dans des cellules dépourvues de pont d'ADN. Il se pourrait alors que CHMP4C soit

impliqué plus généralement dans la régulation temporelle de l'abscission, et notamment dans la régulation de l'abscission par le comportement des cellules filles. La tension dans le pont intercellulaire pourrait favoriser la relocalisation de CHMP4C depuis les côtés du midbody vers la région centrale, ce qui inhiberait l'abscission. A l'inverse, une relâche de tension ou une compression du pont favoriserait la relocalisation de CHMP4C depuis le centre du midbody vers les côtés, ce qui autoriserait l'abscission. Une des difficultés ici est que les travaux de Carlton et collaborateurs montrent clairement que CHMP4C est localisé au centre du midbody lorsque l'abscission est inhibée, mais ils ne distinguent pas si CHMP4C se relocalise sur les bords du midbody lorsque finalement l'abscission a lieu ou si CHMP4C reste au centre du midbody, l'abscission ayant lieu selon un mécanisme autre que la machinerie ESCRT/Spastine classique.

Néanmoins, pour confirmer l'hypothèse selon laquelle CHMP4C serait impliqué dans la régulation de l'abscission par la tension dans le pont, plusieurs expériences sont envisageables :

- Tester si la déplétion de CHMP4C par siRNA abolit la corrélation entre vitesse de séparation des cellules filles et temps d'abscission (pas de retard d'abscission dans des cellules qui se séparent rapidement). Des résultats préliminaires indiquent que cette piste pourrait être prometteuse.

- Etudier la localisation de CHMP4C au cours de la cytocinèse dans différentes conditions. CHMP4C est-il localisé au centre du midbody lorsque les cellules filles sont très séparées et que l'abscission est retardée ? Ensuite, CHMP4C se relocalise-t-il sur les bords du midbody lorsque les cellules filles se rapprochent juste avant l'abscission ?

- Suivre la localisation de CHMP4C pendant les expériences de relâche de tension par ablation : y a-t-il une relocalisation de CHMP4C suite à l'ablation ?

Cette relocalisation de CHMP4C par la tension dans le pont pourrait se produire soit directement, soit par l'intermédiaire de la phosphorylation par AuroraB. En effet, il a été montré que l'inhibition de AuroraB accélère légèrement l'abscission (Steigemann et al., 2009). Cependant, il est peu probable que AuroraB soit intrinsèquement sensible à la tension puisque au niveau des kinétochores, la réparation d'erreurs de bi-orientation implique un éloignement de AuroraB et de ses substrats lors de la mise sous tension des kinétochores, et non un changement d'activité de AuroraB dû à la tension. Au niveau du pont intercellulaire, AuroraB est située des deux côtés du midbody, en forme de cône (Figure 75B). On peut proposer un modèle selon lequel CHMP4C doit sortir de la zone de AuroraB pour échapper à sa phosphorylation et permettre l'abscission, mécanisme cohérent avec le fait que AuroraB est exclue de la zone d'abscission (Hu et al., 2012). Lors d'une compression des microtubules du pont, CHMP4C pourrait sortir de la zone de AuroraB, se localiser à la zone d'abscission dépourvue de AuroraB et induire l'abscission. En revanche si le pont est sous tension,

CHMP4C serait séquestré dans la zone de AuroraB, et donc phosphorylé, se relocalisant alors à la zone centrale du midbody et inhibant l'abscission.

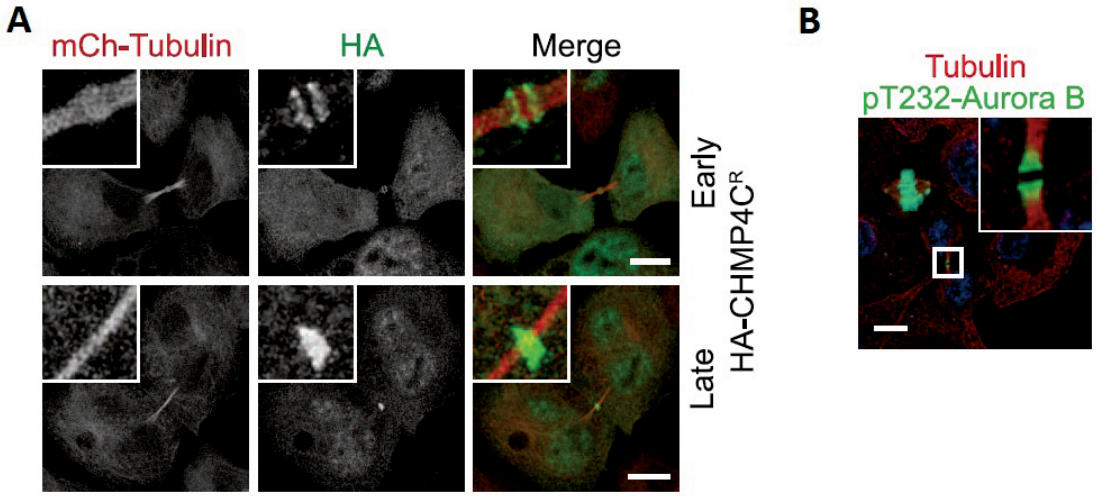


Figure 75 : Localisation de CHMP4C et AuroraB au midbody
A) Localisation de CHMP4C en cytocinèse précoce (en haut) et tardive (en bas). Pour éviter l'effet d'une surexpression, les cellules HeLa mCherry-Tubulin sont traitées par un siRNA dirigé contre CHMP4C et expriment une construction HA-CHMP4C résistante au traitement siRNA, permettant ainsi une expression de CHMP4C proche du niveau endogène. L'immunomarquage par un anticorps anti-HA permet de visualiser la localisation de CHMP4C. B) Immunomarquage de cellules HeLa pour la tubuline (rouge) et AuroraB phosphorylée (vert). Echelles 10 µm. D'après (J. G. Carlton, A. Caballe, et al., 2012).

4. Tension de membrane

Un autre mécanisme pourrait impliquer la tension de membrane qui agirait directement sur les ESCRT-III. Même si aucune étude n'a encore montré une telle régulation des ESCRT-III, il est possible que, comme pour la fission par la Dynamine, la **tension de membrane influence la fission par les ESCRT-III**, en particulier lors de l'abscission. Une forte tension de membrane pourrait empêcher la fission en augmentant la force devant être générée par les ESCRT-III pour rapprocher les deux membranes à fissionner. En effet, lors de la fission, les interactions électrostatiques fortes entre les ESCRT-III et la membrane conduisent à la formation d'une structure en dôme permettant d'apposer les membranes à fissionner (Figure 76). Dans cette configuration, on peut supposer qu'une forte tension de membrane aurait tendance à écarter les membranes et empêcher la fission. Des études *in vitro* de fonctionnalité des ESCRT-III en fonction de la tension de membrane du système utilisé permettraient de confirmer cette hypothèse. De plus, il a été montré que les ESCRT-III s'assemblent préférentiellement sur des membranes déjà légèrement courbées (Fyfe et al., 2011). Ainsi, une tension de membrane plus faible favoriserait l'apparition de zones où la membrane serait courbée, et favoriserait ainsi l'assemblage des ESCRT-III.

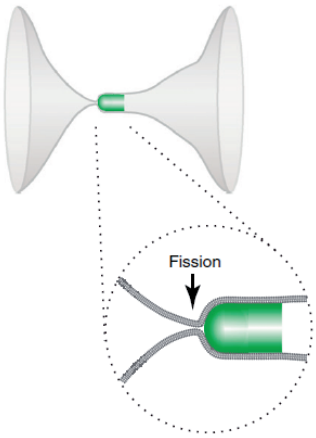


Figure 76 : Structure en dôme des ESCRT-III lors de la fission de membrane
Schéma d'un pont intercellulaire reliant deux cellules filles en fin de cytocinèse. Les ESCRT-III sont représentés en vert. D'après (Guizetti & Gerlich, 2012).

Une étude récente propose un modèle biophysique de la fission de membrane par les ESCRT-III lors de l'abscission (Elia et al., 2012). Les auteurs montrent que l'hélice d'ESCRT-III se forme à partir de l'amas d'ESCRT-III présent au midbody, puis que cette hélice est coupée par Vps4, formant un groupe d'ESCRT-III autonome non attaché au midbody. Ce second groupe glisse alors le long de la membrane jusqu'à trouver une position d'équilibre environ à 0,7 µm du bord du midbody, définissant ainsi le site d'abscission. Dans ce modèle, les auteurs considèrent que la position d'équilibre est déterminée par l'énergie de courbure de la membrane, mais supposent que la tension de membrane n'a pas d'influence sur la position du site d'abscission, le midbody constituant un réservoir de membrane suffisant pour adapter la quantité de membrane en cas de tension. De plus, l'aspect de régulation temporelle de l'abscission n'est pas abordé dans cette étude.

Il serait donc intéressant de mesurer la tension de membrane des cellules filles au cours de la cytocinèse. Une première expérience serait de mesurer la tension sur des cellules filles étalées sur des micro-motifs de différentes tailles puisqu'il est connu que la tension de membrane augmente avec l'étalement. Dans le cas d'un petit micro-motif, on s'attendrait à une faible tension de membrane, associée à un temps d'abscission court ; dans le cas d'un micro-motif grand, on s'attendrait à une tension de membrane plus élevée, associée à une abscission retardée. Une seconde expérience, plus informative mais aussi plus difficile à réaliser, serait de mesurer la tension de membrane tout au long de la cytocinèse. Il serait alors très intéressant de voir si une diminution de tension de membrane précède l'abscission, et si les cellules dont l'abscission est retardée présentent une tension de membrane plus importante que les cellules dont l'abscission est rapide.

La mesure de la tension de membrane est réalisable au moyen d'une pince optique qui stabilise une bille micrométrique traitée avec une substance collante pour la membrane des cellules (Concanavaline A, anticorps spécifiques, ou autre). Il est alors possible de tirer un

tube très fin de membrane en apposant la bille au contact de la membrane puis en éloignant la bille de la cellule. La force exercée sur la bille, mesurée au moyen de la pince optique, permet de calculer la tension de membrane de la cellule (Sheetz & Dai, 1996).

Il est également envisageable de moduler la tension de membrane au moyen de chocs osmotiques : le traitement par un milieu hyperosmotique diminue la tension membranaire car la cellule se vide de son eau, au contraire un traitement par un milieu hypo-osmotique augmente la tension de membrane car la cellule gonfle en se remplissant d'eau. L'utilisation de détergents doux (par exemple le déoxycholate (Raucher & Sheetz, 2000)) permet également de diminuer la tension de membrane. Il faut cependant veiller à ce qu'un changement de morphologie cellulaire lors de ces traitements n'affecte pas la tension globale dans le pont : par exemple lors d'un choc hyperosmotique visant à diminuer la tension de membrane, les cellules pourraient se rétracter et ainsi tirer plus fort sur le pont, rendant les résultats de l'expérience difficiles à interpréter.

5. Mécanotransduction *via* RhoA

On peut penser également que la présence de tension au niveau du pont pourrait induire une voie de mécanotransduction qui inhiberait l'abscission. **RhoA** étant activée lors d'un étirement cellulaire et devant être inactivée dans le pont pour permettre l'abscission (décrit dans l'introduction), il se pourrait qu'une tension dans le pont induise l'activation locale de RhoA, inhibant ainsi l'abscission.

Une façon de tester cette hypothèse serait de **suivre la localisation de RhoA active** au cours de la cytocinèse. Pour cela, la **sonde r-GBD** (RhoA binding domain of rhotekin), qui consiste en une protéine de fusion fluorescente se liant à RhoA lorsque celle-ci est activée (Benink & Bement, 2005), permet de suivre au cours du temps la localisation de RhoA active. Ainsi, il serait possible d'étudier si RhoA active est accumulée au niveau du pont dans des conditions où les cellules se séparent beaucoup (faible densité, micro-motif large) et où l'abscission est retardée. Il serait également envisageable de suivre la localisation de RhoA active lors des expériences d'ablation et de voir si la relâche de tension suite à l'ablation diminue le signal de RhoA active dans le pont, permettant ainsi l'abscission. En revanche, l'expression de cette sonde r-GBD peut avoir un léger effet dominant négatif. La meilleure façon de visualiser la localisation de RhoA active serait alors d'utiliser une sonde FRET ou des anticorps conformationnels utilisables en vivant comme les intrabodies.

De plus, l'expression d'un mutant constitutivement actif de RhoA devrait inhiber l'abscission, donc la relâche de tension par ablation ne devrait pas induire l'abscission dans ces conditions. Au contraire, des cellules exprimant un mutant dominant négatif de RhoA ne devraient pas avoir de retard d'abscission, même si elles se séparent rapidement après la division. La principale difficulté avec l'utilisation de ces constructions mutantes de RhoA est

l'effet d'une sur-activité ou d'une sous-activité de RhoA lors des phases précoces de la division, en particulier lors de l'ingression du sillon de division. Une solution à cela serait de moduler l'activité de RhoA au moyen de drogues, le traitement se faisant sur des cellules dont le pont intercellulaire est déjà formé. Par exemple, la **transférase C3** permet d'**inhiber** RhoA, et certains composés, comme la toxine bactérienne **CNF** (cytotoxic necrotizing factor) ou la **Calpeptine**, permettent de l'**activer**. Une autre difficulté réside cette fois dans l'interprétation des résultats puisque la voie de signalisation régulée par RhoA agit également sur la contractilité cellulaire. Comment différencier alors un effet de contractilité cellulaire, et donc de tension dans le pont, d'un effet de signalisation locale de RhoA au niveau du pont ? L'utilisation d'une construction de RhoA photo-activable serait alors idéale pour activer localement RhoA au niveau du pont.

Une autre façon d'aborder cette piste de réflexion serait d'étudier la GTPase Rac1. Comme RhoA et Rac1 sont mutuellement exclusives en terme d'activité, on pourrait penser activer localement Rac1 au niveau du pont au moyen d'une **construction de Rac1 photoactivable** (Y. I. Wu et al., 2009) afin d'inhiber RhoA et observer si cela induit l'abscission dans les mêmes délais que ceux observés dans les expériences d'ablation. Il serait également intéressant d'étudier si l'abscission est précédée d'une forte activité de protrusion membranaire (« ruffles ») proche du pont. Puisque Rac1 est active dans ces zones de protrusions (Kraynov et al., 2000), cela pourrait inhiber localement RhoA et induire l'abscission.

6. Sur quoi la tension dans le pont est-elle exercée ?

Après avoir discuté des différents mécanismes possibles de régulation de l'abscission par la tension dans le pont, on peut se demander par quel composant cellulaire cette tension dans le pont est supportée. D'après l'organisation et la composition du pont, deux structures pourraient supporter cette tension : les microtubules et/ou la membrane plasmique.

Les premières expériences d'ablation que j'ai réalisées peuvent apporter quelques éléments de réponse à cette question. Le système d'ablation utilisé alors, différent de celui utilisé dans les expériences décrites dans l'article, comportait un laser 2-photon dont la focalisation, très précise en Z, permettait une ablation limitée à une sphère très petite, bien délimitée dans les 3 dimensions. Ainsi, il a été possible de couper les microtubules à l'intérieur du pont intercellulaire sans couper la membrane (Figure 77A et Film 8). Ces expériences préliminaires laissent penser que les microtubules pourraient être sous tension dans le pont, puisqu'on observe un mouvement des cellules qui s'écartent après coupure du faisceau de microtubules, la membrane laissée intacte (Film 9). Ces résultats restent bien sûr à confirmer, par exemple en coupant d'abord les microtubules et en observant une relâche de tension, puis en coupant le tube de membrane et en observant s'il y a une seconde relâche de tension ou non. Il se pourrait en effet que la tension dans le pont soit supportée à la fois par les microtubules et par la membrane plasmique. On peut également proposer un

mécanisme qui évolue au cours du temps, où lorsque le pont est jeune et bien formé, la tension serait majoritairement supportée par les microtubules, et au fur et à mesure que les microtubules disparaissent du pont, surtout pour les modes B et C, la tension dans le pont serait de plus en plus supportée par la membrane. Enfin, des mesures de tension de membrane au moyen d'un système de pince optique permettraient également de savoir si la tension de membrane est impliquée dans la régulation de l'abscission, et donc si la membrane plasmique pourrait supporter la tension dans le pont.

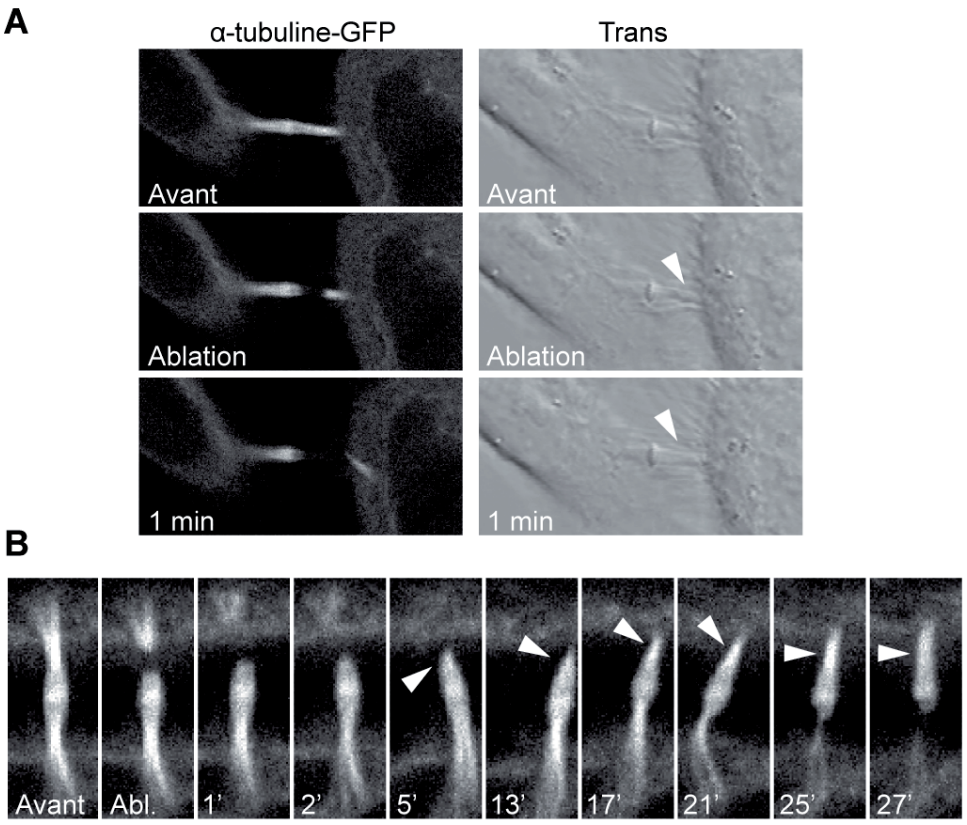


Figure 77 : Ablation des microtubules du pont au moyen d'un laser 2-photon

A) Images avant ablation (haut), immédiatement après ablation (milieu), et une minute après ablation (bas). Les flèches indiquent la membrane intacte après ablation alors que les microtubules sont correctement coupés. Le léger mouvement d'écartement des deux cellules ainsi que le désassemblage du demi-pont après ablation prouvent que les microtubules sont bien coupés et qu'il ne s'agit pas d'une simple extinction de fluorescence. B) Evolution au cours du temps des microtubules du pont (α-tubuline-GFP) après ablation des microtubules sans couper la membrane plasmique. L'échelle de temps est en minutes après ablation (Abl). Les flèches indiquent la repousse des microtubules dans le tube de membrane.

De façon très étonnante, lors de ces expériences préliminaires d'ablation 2-photons, les microtubules étaient capables, après ablation d'un côté du pont en préservant la structure centrale du midbody, de repousser dans le tube de membrane laissé intact et de reformer un pont intercellulaire complet dans un intervalle de temps de 10 à 20 minutes après ablation (Figure 77B et Film 10). Dans cette situation, il est alors difficile de quantifier un délai entre une relâche artificielle de la tension dans le pont et l'abscission, puisque, le pont se reformant rapidement après l'ablation, il pourrait supporter de nouveau une tension

entre les deux cellules filles. Par la suite, j'ai utilisé un système d'ablation permettant de couper à la fois la membrane et les microtubules, pour i) s'assurer que toute la tension était bien relâchée, quelle soit supportée par les microtubules ou par la membrane ; et ii) éviter une repousse des microtubules et une reformation du pont, assurant ainsi une relâche définitive de la tension.

II. Quelques hypothèses sur la fonction de la régulation dans le temps de l'abscission par la tension dans le pont

Dans leur article de 1989, Hartwell et Weinert décrivent la notion de « checkpoint » au cours du cycle cellulaire, et suggèrent que **« In cases where delay occurs, a chekpoint may exist »**, c'est-à-dire que lorsque l'on observe des délais dans certaines étapes du cycle, il est possible qu'un mécanisme de contrôle en soit à l'origine (Hartwell & Weinert, 1989). Dans le cas de l'étude de l'abscission, un mécanisme de contrôle permettant de retarder l'abscission en cas de présence d'ADN dans le pont a été décrit et nommé « abscission checkpoint ». La fonction de ce mécanisme est évidente : éviter une aneuploïdie par refusion des cellules filles ou par coupure aléatoire de l'ADN présent dans le pont. Mais se pourrait-il qu'un mécanisme de checkpoint plus global, au-delà des cas particuliers des ponts d'ADN, contrôle le fait que l'abscission n'intervienne pas de façon prématurée en s'assurant que les étapes précédentes du cycle se sont bien déroulées ? Si tel est le cas, à quoi servirait un tel mécanisme de contrôle ? Plus précisément, pourquoi les cellules filles auraient-elles besoin de maintenir le pont intercellulaire tant que celui-ci est sous tension ? Dans ce paragraphe, j'apporte quelques pistes de réflexion sur les fonctions hypothétiques de la régulation dans le temps de l'abscission par la tension exercée dans le pont intercellulaire et propose un système d'étude permettant l'investigation de cette problématique.

1. Coordination entre abscission et réétalement des cellules filles

Une des fonctions de la régulation temporelle de l'abscission par la tension exercée dans le pont intercellulaire pourrait être de coordonner l'abscission et le réétalement des cellules filles. En effet, la division s'accompagne de modifications importantes de la morphologie cellulaire, souvent accompagnées d'une diminution de l'adhésion de la cellule mitotique avec son substrat. En sortie de mitose, les cellules filles doivent se réétaler sur le substrat et établir de nouvelles adhésions. Le maintien du pont intercellulaire pourrait aider les cellules filles à maintenir leur équilibre mécanique tant que celles-ci ne sont pas complètement ré-étalées et indépendantes mécaniquement. Ceci nécessiterait que la coupure du pont intercellulaire n'intervienne qu'une fois les cellules filles correctement réétalées. Dans ce but, **la tension dans le pont pourrait refléter l'état de réétalement des cellules filles** et servir de mesure du niveau de réétalement des cellules sur leur substrat : lorsque les cellules

ne sont pas encore réétalées, une forte tension est exercée dans le pont intercellulaire puisque les cellules tirent chacune de leur côté pour se réétaler ; au fur et à mesure du réétalement, les cellules établissent de nouvelles adhésions qui assurent la répartition des forces intracellulaires, diminuant la tension dans le pont ; une fois les cellules complètement réétalées, la tension dans le pont diminue encore, autorisant finalement l'abscission (Figure 78). Ainsi, l'inhibition de l'abscission lorsque le pont intercellulaire est sous tension permettrait de maintenir le pont tant que les cellules filles ne sont pas complètement réétalées sur leur substrat.

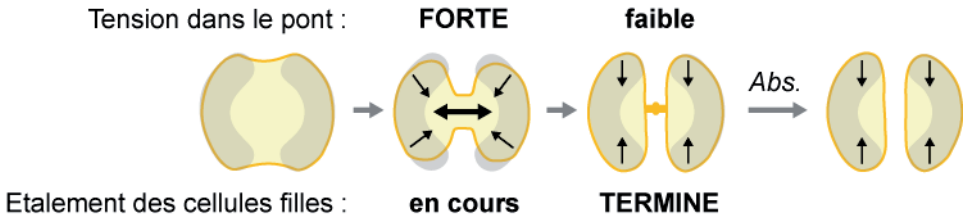


Figure 78 : Relation entre tension dans le pont et étalement des cellules filles
Les cellules sont schématisées étalées sur des micro-motifs adhésifs en forme de doubles parenthèses (gris) qui permettent de séparer les cellules filles. Les forces sont représentées par des flèches noires. Evolution au cours du temps de gauche à droite, en commençant par la cellule mère étalée sur les deux parenthèses. « Abs. » désigne l'abscission.

Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de suivre le réétalement des cellules filles en observant la formation des adhésions focales et voir si l'établissement d'adhésions focales matures précède l'abscission. Au cours de ma thèse, j'ai produit une lignée stable exprimant la Vinculine-GFP et la Tubuline-RFP qui permettrait de suivre à moyenne ou haute résolution l'établissement des adhésions focales et le déroulement de l'abscission. L'utilisation de micro-motifs de formes différentes permettrait également de contrôler la géométrie des adhésions des cellules filles et d'observer son influence sur la régulation temporelle de l'abscission.

Au cours de mes travaux, j'ai également suivi la cytocinèse sur des cellules dont la réadhésion post-mitotique est empêchée. Pour ce faire, des cellules HeLa Kyoto sont synchronisées par « mitotic shake-off » (voir la section Protocoles en Annexe) afin de récupérer uniquement des cellules en métaphase ou anaphase. Ces cellules sont ensuite déposées sur une surface répulsive (traitée à la poly-lysine-PEG) et suivies en vidéomicroscopie. Ces expériences préliminaires ont montré que ces cellules non-adhérentes étaient capables de réaliser l'abscission du pont bien qu'aucune adhésion cellule-substrat n'ait été formée lors de la cytocinèse. Ce résultat pourrait être expliqué par le fait que ces cellules établissent de fortes adhésions cellule-cellule lorsque les adhésions cellule-substrat sont inhibées, formant un doublet de cellules filles très adhésif. L'utilisation d'un marqueur de la membrane plasmique (construction MyrPalm-EGFP) permet la visualisation de la formation de la jonction cellule-cellule entre les cellules filles (Figure 79 A et Film 21). L'observation de la α-Tubuline-EGFP montre que le pont est rejeté sur le côté du

doublet (Figure 79 B et Film 22), et qu'il est très compressé (en forme de coude). Dans ce cas, la tension au niveau du pont est relâchée au fur et à mesure de l'établissement des jonctions cellule-cellule, et l'abscission peut tout de même avoir lieu.

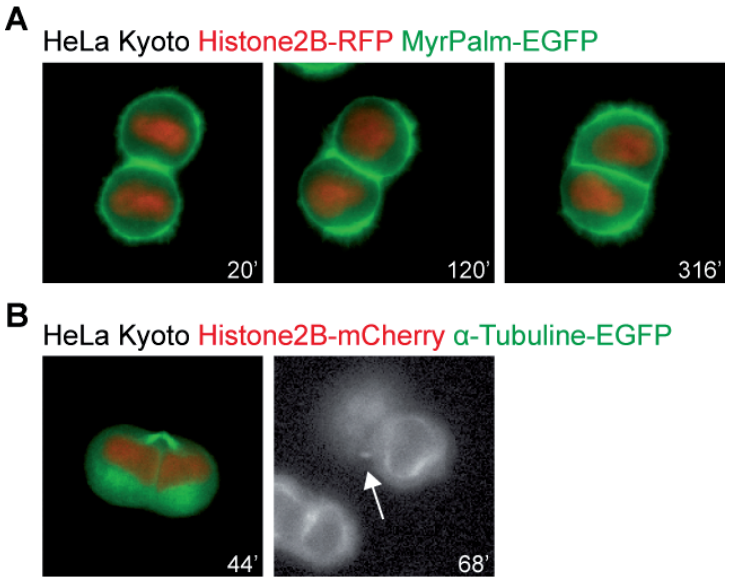


Figure 79 : Cytocinèse et abscission de cellules non-adhérentes

Après mitotic shake-off, les cellules en cytocinèse sont déposées sur une surface non-adhérente (poly-lysine-PEG) et suivies en vidéomicroscopie. A) Utilisation de la construction MyrPalm-EGFP pour suivre la membrane plasmique et la formation de la jonction cellule-cellule. B) Suivi de la cytocinèse et de l'abscission grâce à la α-Tubuline-EGFP. On observe le pont coudé sur le côté du doublet de cellules filles avant abscission. La flèche blanche indique le midbody après abscission. L'échelle de temps est indiquée en minutes après le début de l'expérience.

2. Rétablissement des cellules filles au sein de leur micro-environnement et intégrité tissulaire

La régulation temporelle de l'abscission par la tension dans le pont pourrait également **assurer le rétablissement des cellules filles dans leur environnement après la division** en maintenant le pont intercellulaire tant que les deux cellules filles n'ont pas rétabli des connections adéquates avec leur environnement. En particulier, des cellules adhérentes au sein d'un tissu doivent établir de nouvelles jonctions cellule-cellule entre les cellules filles issues d'une division. Dans ce cas, le pont intercellulaire pourrait compenser les forces qui tendent à écarter les cellules filles et ainsi maintenir physiquement les cellules proches tant qu'elles n'ont pas établi ces nouvelles jonctions. De la même façon que la tension dans le pont pourrait refléter le niveau de réétalement des cellules filles, la tension dans le pont pourrait également refléter le niveau de réadhésion des cellules filles entre-elles : lorsque les cellules ne sont pas réadhérées, la tension dans le pont est forte ; au fur et à mesure que les adhésions s'établissent, la tension dans le pont diminue puisque les adhésions cellule-cellule entre les cellules filles supportent également la tension entre les deux cellules ; finalement, lorsque les adhésions sont complètement établies, la tension dans le pont est nulle,

autorisant l'abscission (Figure 80). Si l'abscission intervient de façon prématurée alors que le pont est encore sous tension, on pourrait penser que les cellules filles seraient séparées brutalement avant que les jonctions cellule-cellule ne soient établies, perturbant ou empêchant complètement la formation des nouvelles jonctions cellule-cellule (Figure 80).

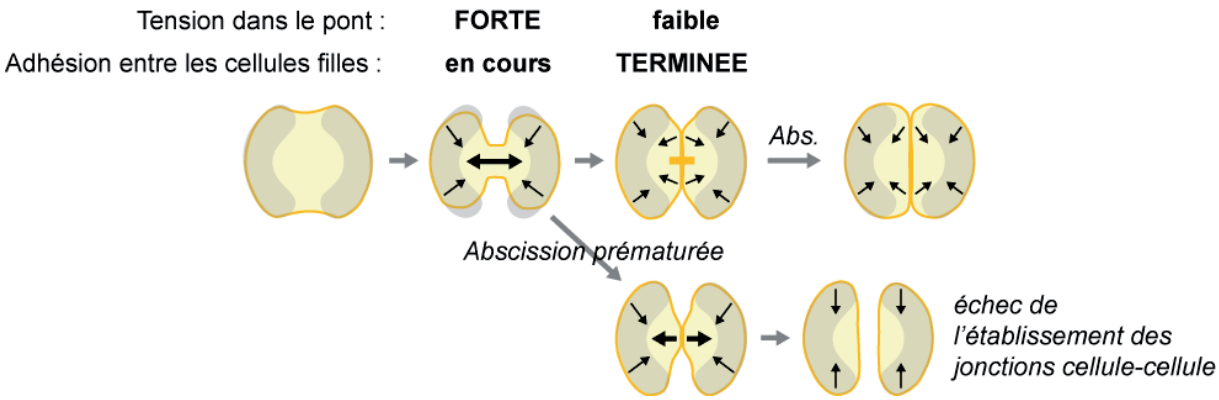


Figure 80 : Evolution de la tension dans le pont au cours de la formation des jonctions cellule-cellule
Les cellules sont schématisées étalées sur des micro-motifs adhésifs en forme de doubles parenthèses (gris) qui permettent de séparer les cellules filles. Les forces sont représentées par des flèches noires. Evolution au cours du temps de gauche à droite, en commençant par la cellule mère étalée sur les deux parenthèses. « Abs. » désigne l'abscission. La coupure du pont prématurée conduit à un échec de la formation des jonctions cellule-cellule entre les cellules filles.

Ainsi, retarder l'abscission tant que les cellules filles ne sont pas correctement ré-insérées dans leur environnement, que ce soit par l'établissement des adhésions cellule-substrat ou des adhésions cellule-cellule, pourrait être un mécanisme assurant l'**intégrité des tissus**. En effet, des expériences réalisées par des collaborateurs, Benoît Ladoux et Sri Ram Krishna Vedula à l'Institut de Mécanobiologie de Singapour, suggèrent qu'un défaut de formation des jonctions cellule-cellule entre les cellules filles issues d'une division pourrait entraîner l'expansion d'un trou au sein d'un épithélium. Dans cette expérience, un épithélium monocouche produit *in vitro* progresse sur un substrat comportant des zones adhérentes et non-adhérentes, formant à certains endroits un épithélium sous tension non adhérent au substrat, tenant uniquement par les adhésions cellule-cellule (Figure 81A). Dans ces conditions, lorsque les cellules se divisent, il y a formation transitoire de trous dans le tissu, rapidement comblés par l'établissement de nouvelles jonctions cellule-cellule à la suite de la division (Figure 81B). En revanche, lorsque le pont intercellulaire est rompu, ici probablement par des forces de traction trop importantes, les cellules filles ne réussissent pas à établir les jonctions cellule-cellule entre elles, et il y a formation d'un **trou dans le tissu qui persiste indéfiniment**. Il s'agit ici bien sûr d'observations fortuites, mais elles illustrent bien que la rupture du pont intercellulaire non contrôlée pourrait être à l'origine de trous persistants dans un tissu de cellules, et donc compromettre son intégrité.

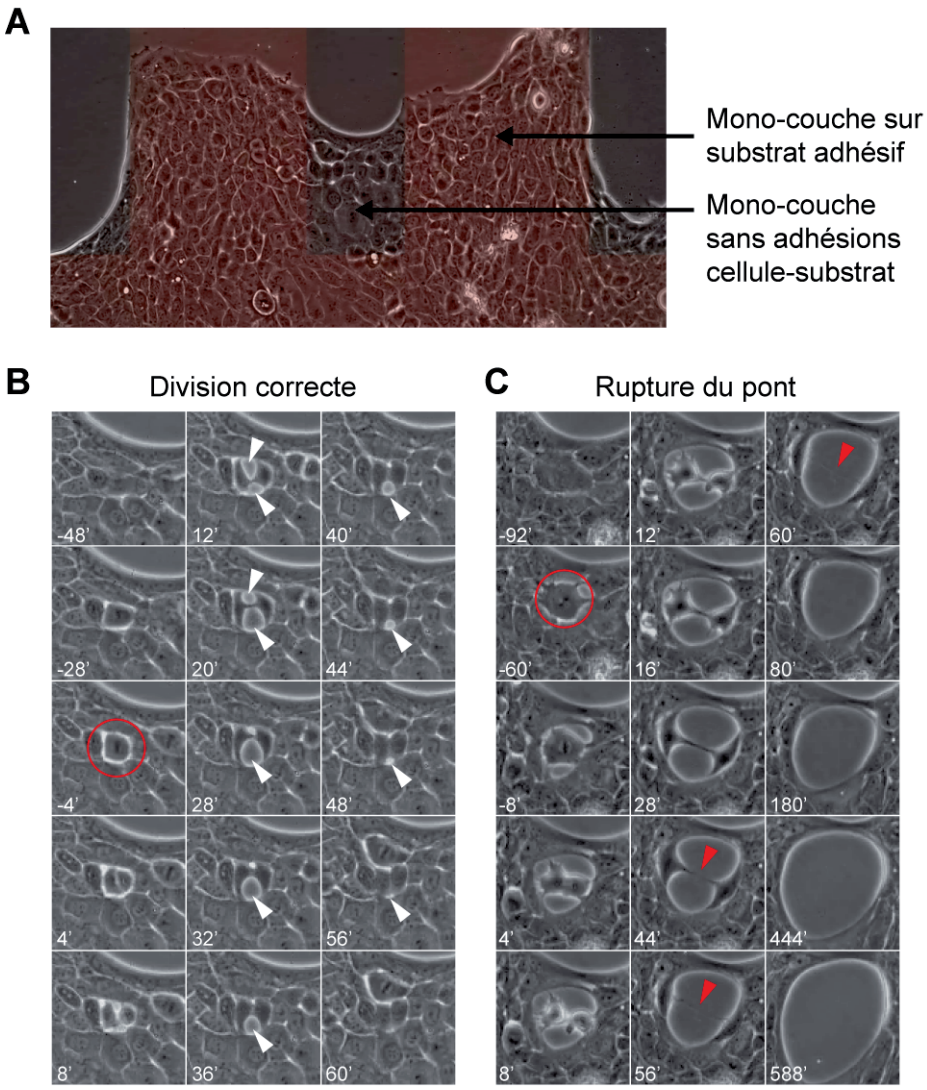


Figure 81 : Division cellulaire au sein d'un épithélium sous tension

A) Image en contraste de phase d'un épithélium monocouche de cellules HaCat (kératinocytes humains) sur une surface traitée à certains endroits par des protéines de matrice extracellulaire (zones rouges). On observe un ménisque au niveau du front de l'épithélium sous tension. B) Images au cours du temps d'une division correcte (à gauche) au sein de l'épithélium ; les flèches blanches indiquent la formation transitoire de trous dans l'épithélium puis la refermeture de ce trou au fur et à mesure de l'établissement des jonctions cellule-cellule entre les cellules filles. A droite, la rupture prématurée du pont intercellulaire entraine la formation d'un trou persistant dans le tissu ; les flèches rouges indiquent la rupture du pont intercellulaire sous l'effet de forces trop grandes. Temps indiqué en minutes à partir de l'anaphase, les cercles rouges indiquent les cellules en métaphase. Films réalisés par Sri Ram Krishna Vedula et Benoît Ladoux à l'Institut de Mécanobiologie de Singapour.

Retarder la coupure du pont intercellulaire tant que les cellules filles ne sont pas stablement rétablies dans leur micro-environnement pourrait également être un mécanisme permettant d'**éviter la perte d'une cellule suite à une division**. Au cours de la division, la cellule mère diminue ses adhésions avec son environnement, et en sortie de mitose, les cellules filles doivent se ré-insérer stablement dans leur environnement en rétablissant des contacts cellule-substrat et cellule-cellule. Dans le contexte d'un épithélium monocouche polarisé, les divisions cellulaires se font généralement parallèlement au substrat de sorte que les cellules filles conservent toutes deux des attaches aux cellules voisines pendant la division. Par

contre, si l'axe de la division vient à être légèrement perturbé, il se pourrait qu'une des deux cellules filles soit exposée à la surface de l'épithélium, ne conservant que de très faibles adhésions avec son environnement (Figure 82). Si en plus cette cellule est exposée à un flux, comme le flux sanguin par exemple, de fortes contraintes mécaniques pourraient emporter la cellule si celle-ci n'est pas correctement maintenue à l'épithélium. Dans ce cas, maintenir le pont intercellulaire tant qu'il est sous tension (ici, la non-adhésion de la cellule ou le flux augmenterait nettement la tension dans le pont), permettrait de garder la cellule ancrée dans l'épithélium en attendant qu'elle ait rétablie ses adhésions avec les cellules voisines. Si au contraire le pont est coupé trop tôt, c'est-à-dire avant que la cellule ait pu se ré-adhérer correctement à son environnement, la cellule pourrait être perdue dans le milieu extracellulaire, le lien physique la maintenant au tissu (dans ce cas le pont intercellulaire) ayant été coupé trop tôt. Ainsi, l'intégrité du tissu serait largement compromise, et la relâche incontrôlée de cellules hors de leur environnement d'origine pourrait potentiellement conduire au déclenchement de réactions qui n'auraient pas lieu d'être, ou peut-être même favoriser un processus métastatique ou initier l'apparition d'un cancer.

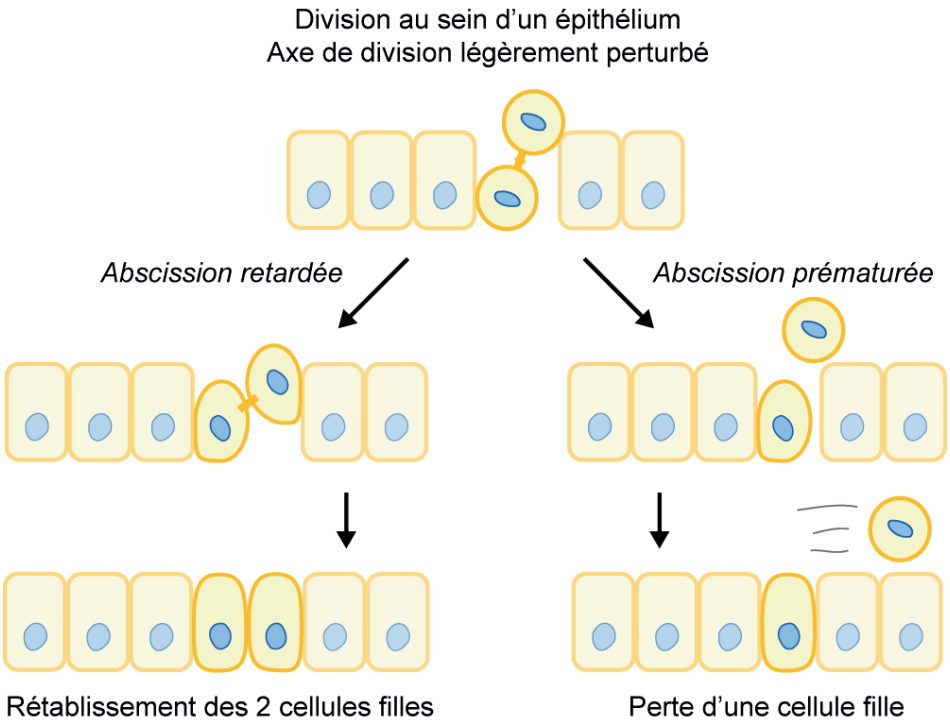


Figure 82 : Régulation temporelle de l'abscission participant à l'intégrité d'un épithélium

3. Formation des jonctions cellule-cellule entre cellules filles

La formation de la nouvelle jonction cellule-cellule entre les cellules filles issues d'une division est encore mal comprise, et le rôle du pont intercellulaire dans ce processus est encore plus vague. Par exemple, il n'est pas connu si la jonction entre les deux cellules

s'établit comme un « zip » de fermeture éclair à partir du pont vers l'extérieur, ou depuis l'extérieur vers le pont comme le septum des levures, ou bien si la formation de la jonction s'établit partout en même temps entre les deux cellules filles. En plus du rôle mécanique du pont afin de maintenir les deux cellules filles proches l'une de l'autre, le pont intercellulaire pourrait également participer de façon active à l'établissement de la jonction cellule-cellule, par exemple en induisant localement certaines voies de signalisation nécessaires à la formation de la jonction, ou en participant à la formation de structures autour du pont entre les deux cellules filles. Au cours de mes expériences, j'ai eu l'occasion d'observer des **structures en forme de filopodes contenant de l'actine autour du pont intercellulaire** (Figure 83). Ces structures, provenant de chacune des deux cellules filles, semblent s'interdigiter entre elles en cytocinèse précoce lorsque les cellules sont proches l'une de l'autre. En cytocinèse tardive, ces filopodes sont localisés aux extrémités du pont, lui-même plus long et dépourvu d'actine en son centre.

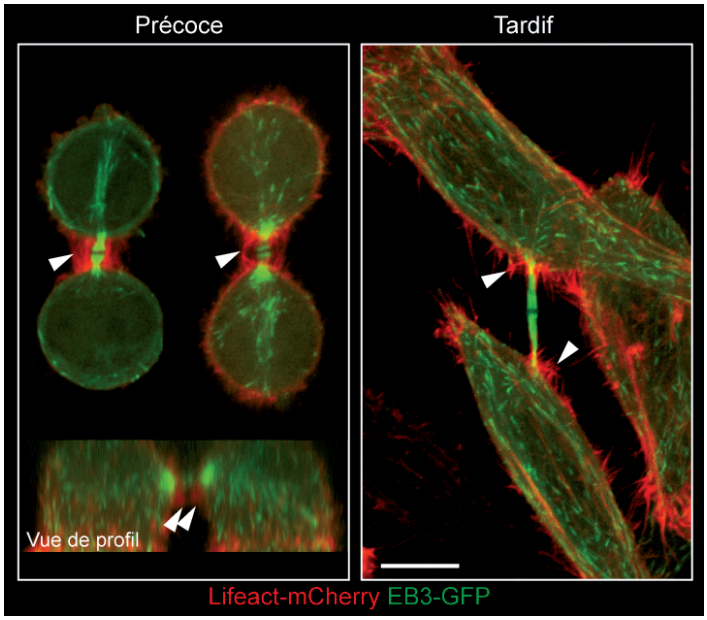


Figure 83 : Présence de filopodes autour du pont intercellulaire
Images acquises en microscopie confocale à spinning disk de cellules HeLa exprimant les constructions Lifeact-mCherry (sonde de l'actine polymérisée) et EB3-GFP (localisée aux bouts « plus » des microtubules). Les flèches indiquent les filopodes présents autour du pont intercellulaire en cytocinèse précoce puis aux extrémités du pont en cytocinèse tardive. Echelle 10 µm.

De façon intéressante, il a été montré que la formation de jonctions adhérentes entre deux cellules en interphase est assistée par des structures riches en actine qui s'interdigitent entre les deux cellules (pour une revue voir (Baum & Georgiou, 2011)). *In vitro*, l'initiation du contact entre les cellules se fait *via* les lamellipodes, alors qu'*in vivo*, des filopodes formés à partir des deux cellules s'interdigitent pour aider la fusion de deux feuillets d'épithélium

(Figure 84A). De plus, lors de la fermeture dorsale de l'embryon de Drosophile, processus morphogénétique où deux feuillets épithéliaux fusionnent en formant de nouvelles jonctions cellule-cellule entre les feuillets (pour une revue voir (P. Martin & Wood, 2002)), de nombreux filopodes s'interdigitent entre les cellules et induisent la formation des jonctions adhérentes entre les deux épithéliums (Figure 84B). Dans le contexte de l'établissement de la nouvelle jonction cellule-cellule entre les cellules filles issues d'une division, les structures en forme de filopodes observées autour du pont pourraient avoir une fonction similaire à celle des filopodes de la fermeture dorsale, en aidant la formation de la jonction cellule-cellule entre les deux cellules filles. Le pont intercellulaire pourrait alors à la fois permettre que les cellules soient suffisamment proches pour que les filopodes puissent s'interdigiter, et participer activement à la formation de ces filopodes, par exemple en maintenant la polarité post-mitotique acquise au début de la cytocinèse.

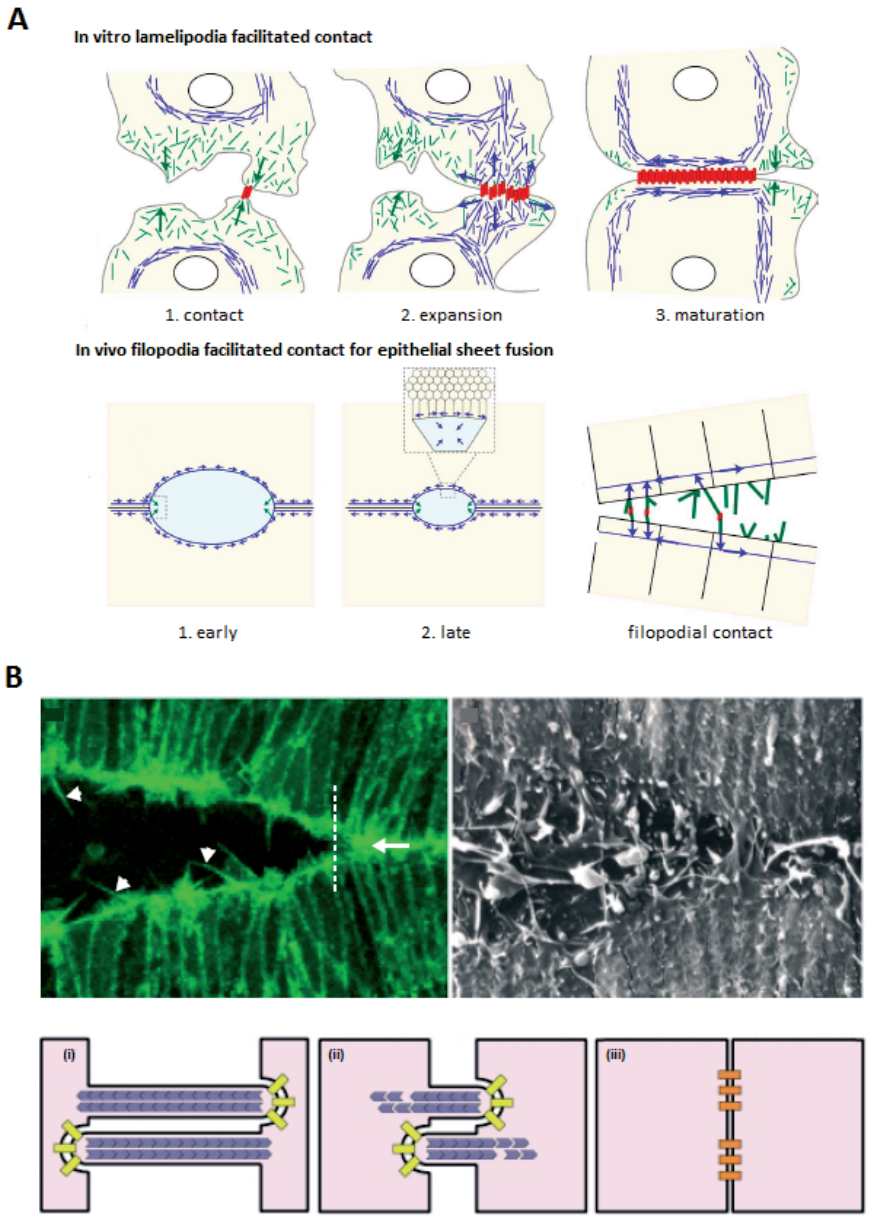


Figure 84 : Formation des jonctions cellule-cellule

A) Formation de la jonction adhérente assistée par des structures d'actine : lamélipodes in vitro, filopodes in vivo. Adapté de (Baum & Georgiou, 2011). B) Images de la fermeture dorsale au cours du développement de l'embryon de Drosophile. A gauche, GFP-actine, à droite microscopie électronique à balayage. Les flèches indiquent les filopodes provenant des deux feuillets. Le schéma au dessous illustre le principe d'interdigitation des filopodes conduisant à la fermeture en « zip » du trou entre les deux feuillets d'épithélium. Adapté de (P. Martin & Wood, 2002).

4. Morphogenèse embryonnaire

Le maintien du pont intercellulaire entre les deux cellules filles pourrait également être impliqué dans des processus de morphogenèse. Si en général il est relativement difficile d'observer les ponts intercellulaires dans les tissus où les cellules sont très proches les unes des autres, quelques études reportent tout de même l'observation de **ponts très étirés** au cours du développement embryonnaire. En 1975, Bellairs et Bancroft observent en

microscopie électronique à balayage de longs fils fins reliant des paires de cellules sur la surface dorsale de l'embryon de poulet, les deux cellules pouvant parfois être séparées par plusieurs autres cellules (Bellairs & Bancroft, 1975). Ils remarquent la présence d'une structure en forme de bille au milieu de ces fils fins. Après analyse de ces structures en microscopie électronique à transmission, les auteurs concluent que ces fils pourraient être des ponts intercellulaires entre deux cellules filles issues d'une division. En 1988, Kageyama observe également des ponts intercellulaires très allongés (jusqu'à 50 µm) dans l'embryon du poisson *Oryzias latipes* (Kageyama, 1988). Ces ponts sont observés au stade blastula au moment où les divisions commencent à être asynchrones et où les cellules deviennent plus motiles et forment des pseudopodes. L'auteur suppose que ces ponts s'allongent quand les cellules sont plus motiles. Il observe à un stade plus tardif (gastrula) une diminution de l'apparition de ces ponts, qu'il explique par le fait que les cellules sont plus nombreuses et ont de ce fait moins de place pour se séparer et former ces ponts étirés. Il est intéressant de relier ces observations avec mes travaux de thèse, qui montrent que des cellules plus motiles sont connectées plus longtemps par le pont intercellulaire. En revanche, dans les observations de Kageyama, il est difficile de discriminer si ces ponts étirés existent parce qu'il y a un retard d'abscission (par exemple à cause d'un pont d'ADN), ou si l'abscission est retardée parce que les cellules sont intrinsèquement plus motiles. Une étude récente montre également la présence de ponts intercellulaires très allongés au début de la gastrulation dans l'embryon de poisson zèbre (Caneparo et al., 2011). Ces ponts, reliant deux cellules issues d'une mitose (Figure 85), peuvent être longs de plusieurs diamètres de cellules (jusqu'à plus de 200 µm). Les auteurs formulent l'hypothèse que ces ponts rendent possible une communication entre les deux cellules filles grâce au passage de molécules à travers le pont d'une cellule à l'autre, communication potentiellement importante pour un échange d'information ou une synchronisation. Les auteurs suggèrent également que la présence de cytosquelette (actine et microtubules) aux extrémités du pont puisse conférer à ces ponts un rôle mécanique : exercer une tension ou transmettre aux cellules une information d'ordre mécanique.

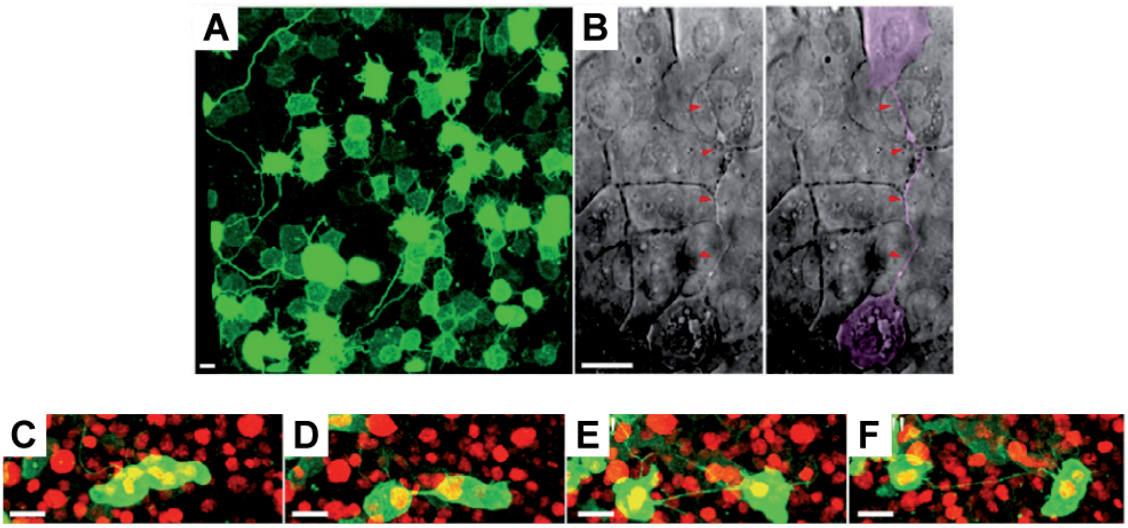


Figure 85 : Présence de ponts intercellulaires dans l'embryon du poisson zèbre
A) Au début de la gastrulation, expression aléatoire de mDendra2 permettant d'obtenir une mosaïque de cellules fluorescentes (vert) dans l'épiblaste. On observe de nombreux ponts intercellulaires. B) Images en DIC de cellules connectées par un pont intercellulaire (flèches rouges) et représentée en violet sur l'image de droite. C) à F) Vidéomicroscopie confocale d'une cellule en division formant un pont intercellulaire au stade blastula. L'ADN est représenté en rouge (Histone2B-mCherry) et les contours cellulaires en vert (mDendra2). Echelles 20 µm. D'après (Caneparo et al., 2011)

De façon intéressante, la **morphogenèse du tube neural** au cours du développement du poisson zèbre requiert une **division cellulaire en symétrie miroir** afin de former l'axe de symétrie de l'organe et le lumen du tube neural (Tawk et al., 2007). Lors de cette division, la cellule mère produit deux cellules filles qui se positionnent en symétrie miroir de part et d'autre de l'axe de symétrie du futur organe (Figure 86A). Les cellules filles migrent de façon coordonnée jusqu'à atteindre leur position finale où elles se polarisent : l'extrémité basale à la périphérie du tube, et l'extrémité apicale au niveau du pont intercellulaire où le lumen est ensuite formé (Figure 86B). Il est alors intéressant de se demander si le pont intercellulaire reste intact pendant la migration des cellules filles, et si l'abscission n'intervient qu'une fois les cellules filles positionnées à leur emplacement final. On pourrait penser en effet que la migration des cellules filles puisse mettre le pont sous tension, inhibant ainsi l'abscission. Lorsque les cellules filles atteignent leur position définitive, elles arrêtent de migrer, ce qui aurait comme conséquence de relâcher la tension dans le pont et permettrait l'abscission. Dans ce cas, la présence physique du pont intercellulaire aurait pour fonction de coordonner la migration des cellules après la division, indiquant mécaniquement la position relative des cellules filles : en tirant sur le pont, une cellule fille pourrait savoir en retour la position de sa cellule sœur, se polariser en fonction de la direction de la force, et migrer à l'opposé de sa cellule sœur. Il serait intéressant de réaliser le knockout de CHMP4C dans le poisson zèbre et d'observer si une abscission trop rapide induit des défauts de morphogenèse du tube neural.

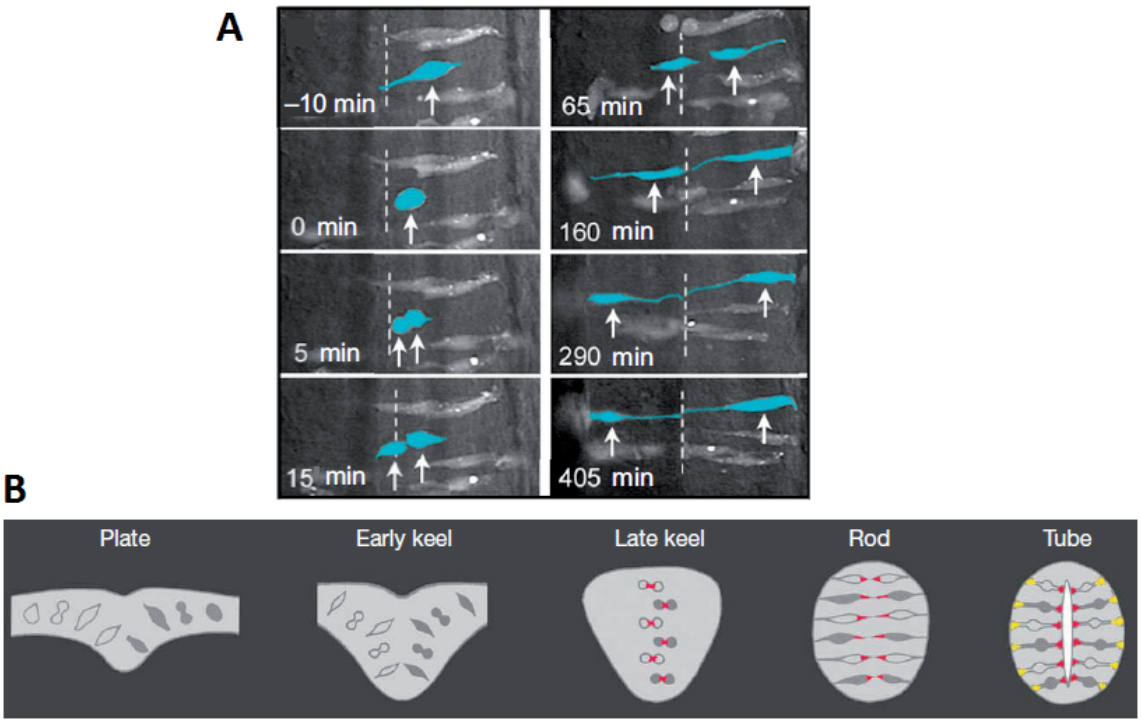


Figure 86 : Division en symétrie miroir lors de la morphogenèse du tube neural
A) Images de vidéomicroscopie d'une division en symétrie miroir participant à l'établissement de l'axe de symétrie lors de la formation du tube neural chez le poisson zèbre. Vue de la surface dorsale du tube neural. La cellule mère et les cellules filles sont colorées en bleu en post-traitement et indiquées par des flèches pour une meilleure visibilité. Le temps est indiqué en minute, 0 min correspondant au début de la division. B) Représentation schématique de la formation du tube neural. Les cellules du côté droit sont représentées en gris plein, celles de gauche en contour gris. Le marqueur de polarité Pard3 est représenté en rouge (côté lumen) et le marqueur basal GFAP en représenté en jaune. D'après (Tawk et al., 2007).

La Figure S11 du manuscrit de l'article montre les résultats d'expériences préliminaires réalisées dans le but d'étudier si les migrations des cellules filles pourraient être corrélées lorsqu'elles sont reliées par le pont intercellulaire. Ces expériences, décrites dans les informations supplémentaires de l'article, ont montré que la vitesse de séparation des cellules filles est constante avant l'abscission (l'augmentation de la distance entre les deux cellules est linéaire), alors qu'après l'abscission, les cellules ont des migrations beaucoup moins corrélées (elles arrêtent de se séparer, ou se rapprochent, ou se séparent). Ces résultats suggèrent donc que les migrations des cellules filles pourraient être corrélées tant que les cellules sont reliées par le pont intercellulaire, et qu'après coupure du pont lors de l'abscission, les migrations deviennent indépendantes. D'autres expériences seraient nécessaires pour démontrer que le lien physique par le pont intercellulaire est bien à l'origine de cette corrélation de migration. On pourrait par exemple suivre la migration des cellules filles après division, **couper le pont intercellulaire par ablation** avant qu'il ne soit coupé naturellement lors de l'abscission, et suivre la migration après ablation du pont. Si les cellules perdent leur corrélation de migration dès l'ablation du pont, cela signifierait que la rupture du lien physique entre les deux cellules filles abolit la corrélation de migration (Figure 87). Il serait également intéressant de **micromanipuler le pont**, par exemple au

moyen d'une pointe d'AFM ou d'une micropipette, afin de **modifier l'axe des forces** dans le pont. On pourrait alors observer si les cellules réorientent leur migration selon ce nouvel axe de forces (Figure 87). Si tel est le cas, cela prouverait que les forces exercées entre les deux cellules filles par l'intermédiaire du pont sont à l'origine de la direction de migration des cellules filles. Ces forces pourraient agir en induisant une polarité particulière des cellules filles, déterminant ainsi la direction de migration. Cette expérience de micromanipulation du pont permettrait donc de distinguer si la polarisation des cellules filles, contrôlant leur directionnalité, est établie grâce aux forces exercées au niveau du pont intercellulaire ou par la persistance de la polarité acquise au début de la cytocinèse (discuté en introduction).

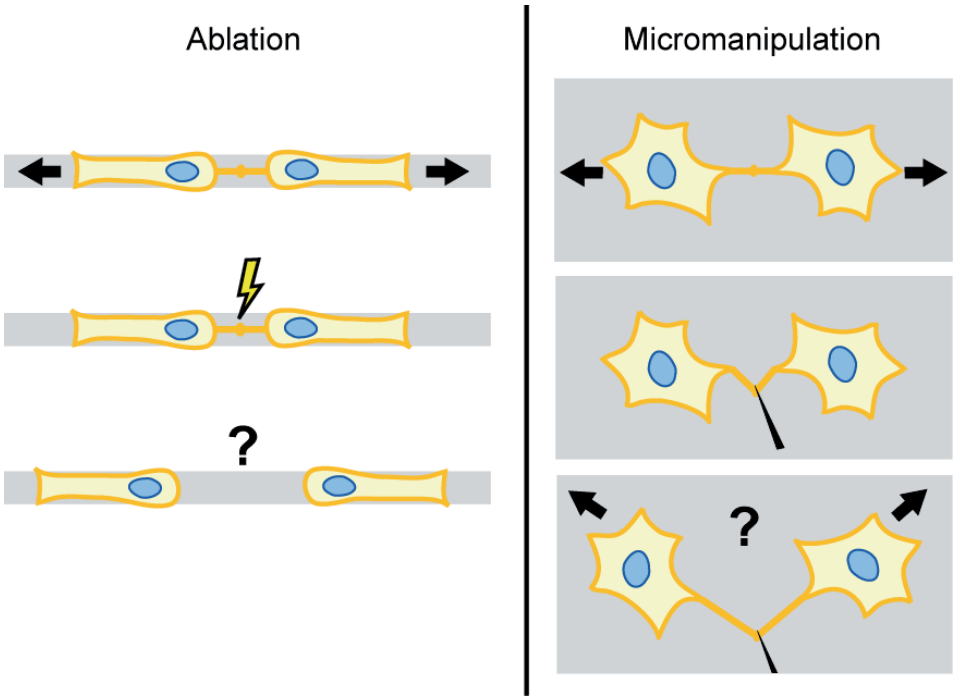


Figure 87 : Expériences d'ablation et de micromanipulation du pont
L'objectif est de tester si les migrations des cellules filles sont corrélées entre elles grâce au lien physique que constitue le pont intercellulaire. A gauche, cellules cultivées sur des lignes adhésives (migration 1D), à droite, cellules cultivées sur substrat traité de façon homogène par une molécule adhésive (migration 2D). Les flèches représentent la direction de migration.

5. Comment étudier la fonction de cette régulation ?

Pour étudier la fonction de la régulation temporelle de l'abscission par les forces exercées sur le pont, il est important de se placer dans des conditions où le maintien du pont est essentiel au devenir des cellules filles, et où une abscission trop rapide provoquerait potentiellement des défauts. La culture cellulaire 2D est peu adaptée à ce type d'étude puisque l'homéostasie cellulaire ne semble pas perturbée lors des expériences d'ablation réalisées au cours de mes travaux de thèse. En revanche, il serait possible de se placer dans les contextes décrits dans les paragraphes précédents, en étudiant par exemple des cellules

capables d'établir des jonctions adhérentes entre elles, un épithélium monocouche sous tension, ou encore un épithélium soumis à un flux. D'autre part, il est important de trouver des conditions permettant une abscission constitutivement accélérée. L'ablation du pont n'est pas un système simple à mettre en œuvre, il est difficilement compatible avec une monocouche de cellules, et ne permet pas de couper le pont à des temps vraiment précoces sans endommager les cellules. Comme la déplétion de CHMP4C accélère l'abscission des cellules HeLa en culture *in vitro*, on pourrait penser que la déplétion de CHMP4C constitue un outil robuste permettant d'induire une abscission toujours trop rapide. De plus, des expériences préliminaires montrent que le traitement par siRNA dirigé contre CHMP4C, simple à mettre en œuvre, présente peu d'effets secondaires : les divisions se déroulent normalement et la mortalité cellulaire n'est pas ou peu affectée. Ainsi, la déplétion de CHMP4C combinée à un système cellulaire ou multicellulaire adéquat, pourrait permettre d'étudier plus en profondeur la fonction de la régulation de l'abscission par l'environnement cellulaire, et en particulier d'élucider les points suivants : lorsque cette régulation est perturbée,

- y-a-t-il perturbation de la formation de l'adhésion cellule-cellule entre les cellules filles ?
- y-a-t-il perturbation de l'intégrité des tissus avec accumulation de trous au sein d'un épithélium sous tension ?
- y-a-t-il des pertes de cellules suite à des divisions au sein d'un épithélium, soumis ou non à un flux ?
- y-a-t-il un défaut de morphogenèse du tube neural chez l'embryon du poisson zèbre ?

III. Mise en perspective

1. Des résultats contre-intuitifs

Lorsque j'ai commencé mes travaux de thèse, le mécanisme moléculaire de l'abscission était loin d'être compris, en particulier le modèle de fission de membrane par les ESCRT-III associée à la coupure des microtubules par la Spastine n'était pas encore proposé. De plus, la description de la cytocinèse par traction des cellules filles chez l'amibe *Dictyostelium discoideum*, et les travaux de Burton et Taylor de mesure de forces sur substrat de silicone déformable, suggéraient fortement que les cellules filles exercent des forces de traction sur le pont dans le but de le rompre. Dans ce contexte, l'hypothèse selon laquelle une tension dans le pont pourrait au contraire empêcher l'abscission était plutôt originale et contre-intuitive. Pourtant, l'observation de cellules peu motiles montre que la coupure du pont opère de façon très nette, peu compatible avec une rupture, et les cellules au sein d'un tissu *in vivo* ont généralement peu de place pour se séparer et casser le pont par traction. De plus,

d'un point de vue physiologique, il serait étonnant que la toute dernière étape de la division cellulaire, irréversible qui plus est, soit laissée au hasard des mouvements des cellules filles sans aucune régulation. Ainsi, l'hypothèse qu'un mécanisme actif puisse prendre en charge la coupure du pont, mécanisme régulé au niveau moléculaire, avait du sens.

Lors de travaux antérieurs effectués au laboratoire, plusieurs observations laissaient penser que la tension dans le pont pouvait influencer le moment où l'abscission intervenait : des cellules avec des ponts plus tendus avaient tendance à se couper plus tard, et un mouvement du midbody au sein du pont, avec rapprochement du midbody d'une des deux cellules filles, induisait la coupure du pont du côté de cette cellule. Ces observations ont naturellement mené à se poser les questions suivantes : est-ce qu'une relâche de tension pourrait faire bouger le midbody au sein du pont et induire la coupure ? Au contraire, est-ce qu'une tension permanente dans le pont retarderait indéfiniment l'abscission ?

Finalement, mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence et de caractériser la régulation temporelle de l'abscission par la tension exercée au niveau du pont intercellulaire. Comme Burton et Taylor (Burton & Taylor, 1997), j'ai observé que les cellules filles sont contractiles en sortie de mitose et exercent des forces importantes au cours de leur réétalement. Mais au contraire de leur théorie selon laquelle les forces de tractions permettent de rompre le pont intercellulaire, j'ai montré que la tension exercée dans le pont devait diminuer pour permettre la coupure du pont au moyen de la machinerie spécialisée ESCRT/Spastine.

2. Point de rencontre de deux modèles d'abscission

L'étude des microtubules du pont au cours de la cytocinèse a permis de décrire plusieurs modes d'abscission basés sur l'organisation, la dynamique, et le mode de coupure lors de l'abscission des microtubules du pont. Pour rappel, voici les trois modes décrits dans les informations supplémentaires de l'article et illustrés dans les Figures S3 et S4 de l'article :

- le **mode A** : coupure très nette des microtubules, de part et d'autre du midbody successivement
- le **mode B** : désassemblage très progressif des microtubules, pas de coupure nette des microtubules
- le **mode C** : détachement du faisceau de microtubules du cortex des cellules, probablement sous l'effet d'une séparation trop rapide des cellules filles

Le mode A correspond au mécanisme d'abscission par la machinerie ESCRT/Spastine, la Spastine coupant les microtubules de façon très nette et les ESCRT-III assurant la fission de la membrane à la suite de la coupure des microtubules. En revanche, dans les modes B et C, cette machinerie ESCRT/Spastine est largement perturbée : la coupure par la Spastine

semble complètement inhibée puisque le désassemblage des microtubules est très similaire à celui des cellules dont la Spastine a été déplétée par siRNA ; et l'organisation des ESCRT-III au midbody est très perturbée. Il se pourrait alors qu'une autre machinerie d'abscission prenne le relai de cette machinerie ESCRT/Spastine afin d'assurer l'abscission dans les cas où les cellules filles se séparent rapidement après la division. La quantification du temps d'abscission en fonction de la longueur maximale du pont, avec un code couleur pour les modes d'abscission, illustre bien ce mécanisme (Figure S4F de l'article) : les modes A ont une bonne corrélation entre ces deux paramètres (en rouge, première phase du graphe), alors que les modes B et C ont des temps d'abscission longs qui ne dépendent pas de la longueur du pont, elle-même souvent très importante (en vert et bleu, seconde phase du graphe en forme de plateau). Cela suggère que la machinerie ESCRT/Spastine permettant l'abscission des modes A est régulée par la tension dans le pont, et qu'à partir d'une certaine tension seuil cette machinerie est complètement inhibée, un autre mécanisme prenant alors le relai pour assurer la coupure du pont intercellulaire.

La coupure des microtubules dans le cas des modes B pourrait être assurée par le **désassemblage progressif des microtubules**. Il est intéressant de comparer l'évolution de l'intensité de fluorescence des microtubules du pont dans les modes A et B (Figure S3C de l'article, reprise ici pour plus de clarté en Figure 88). Que ce soit en mode A ou en mode B, le faisceau de microtubules diminue fortement d'intensité après l'anaphase (noté 1 sur la Figure 88) ; puis dans une seconde phase (notée 2) il continue de diminuer d'intensité mais cette fois de façon très progressive. Enfin, en mode A le faisceau est coupé très nettement par la Spastine, alors qu'en mode B le faisceau continue sa diminution progressive à la même vitesse, pour finalement aboutir à l'abscission lorsque tous les microtubules du pont sont désassemblés. Cette diminution progressive du nombre de microtubules dans le pont a déjà été décrite (Elad et al., 2011). Il serait intéressant d'étudier si elle provient d'une activité de dépolymérisation naturelle des microtubules, ou si un mécanisme actif en est responsable. Par exemple, la Katanine, une autre enzyme de coupure des microtubules présente au niveau du pont intercellulaire, pourrait être responsable de ce lent désassemblage. On pourrait étudier par exemple si la déplétion de la Katanine empêche cette phase de diminution du nombre des microtubules du pont, sans altérer la coupure nette par la Spastine lors de l'abscission. Finalement, une fois le pont dégagé de tous les microtubules, la **fusion de vésicules** du trafic intracellulaire pourrait aider les ESCRT-III à assurer la fission de la membrane puisque ceux-ci sont désorganisés mais tout de même indispensables à l'abscission (la déplétion de CHMP2A inhibe complètement l'abscission, le pont ne pouvant pas se couper autrement que par rupture). Le cas du mode C semble être un cas extrême, peut-être dû aux conditions de culture 2D favorisant un fort étalement, une forte motilité et une forte contractilité des cellules. En général, après la phase où les microtubules du pont sont déconnectés des cortex cellulaires, le faisceau de microtubules se reforme dans la totalité du pont, et l'abscission a lieu de façon très retardée soit comme un mode A (coupure nette) soit comme un mode B (désassemblage progressif).

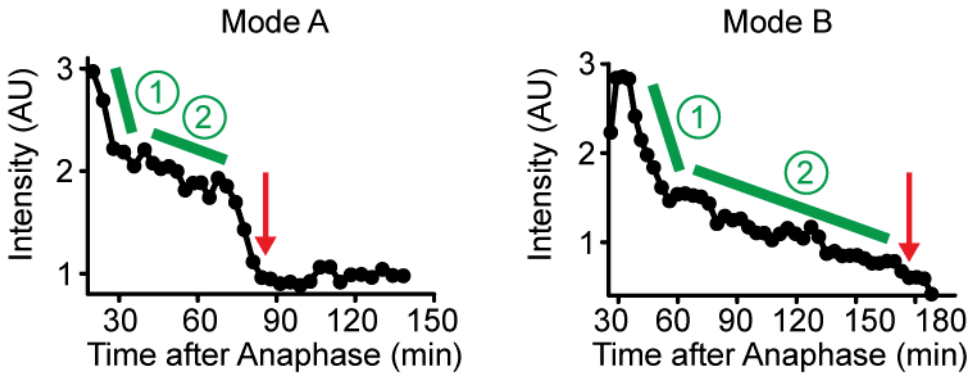


Figure 88: Evolution de l'intensité de fluorescence des microtubules du pont pour les modes A et B
Rappel de la Figure S3C de l'article. Mesure de l'intensité de fluorescence (unité arbitraire) de la tubuline au niveau du pont intercellulaire au cours du temps, pour des cellules utilisant le mode d'abscission A ou B. Les flèches rouges indiquent l'abscission. La première phase de forte diminution de l'intensité du faisceau de microtubules est notée 1, la seconde phase de diminution progressive de l'intensité du faisceau est notée 2 (en vert).

L'un des points forts de ces travaux est la proposition d'un modèle d'abscission cohérent à la fois avec le modèle d'abscission par la machinerie ESCRT/Spastine et à la fois avec le modèle par la fusion de vésicules. En effet, les études qui ont décrit la machinerie ESCRT/Spastine correspondent parfaitement à la description des modes A : temps d'abscission du même ordre de grandeur, morphologie des ponts similaire, coupure des microtubules et localisation des ESCRT-III identiques (Guizetti et al., 2011; Elia et al., 2011). En revanche, d'autres études reportent des ponts intercellulaires très longs, associés à des temps d'abscission très longs également (Schiel et al., 2011; Dambournet et al., 2011; Böttcher et al., 2009). Cette seconde série d'études revendique un mécanisme d'abscission différent, principalement basé sur la fusion des vésicules du trafic intracellulaire. Il serait alors intéressant d'étudier la dynamique des microtubules dans ces conditions, et de voir si elle correspond aux modes B et C décrits dans mon travail. Si tel est le cas, il serait possible de proposer un mécanisme unique, avec une machinerie ESCRT/Spastine dans le cas où le pont n'est pas sous tension, machinerie régulée dans le temps par une tension dans le pont si celle-ci est inférieure à un certain seuil, et un système de secours assurant l'abscission par le désassemblage des microtubules et la fusion de vésicules lorsque la machinerie ESCRT/Spastine est complètement inhibée par une trop forte tension entre les cellules filles. Dans ce cas, les différences observées par les deux séries d'études seraient expliquées par une différence de motilité des cellules étudiées, une faible motilité favorisant une abscission selon le mode A, et une forte motilité favorisant une abscission selon les modes B et C.

3. Les ESCRT au cœur de la régulation temporelle de l'abscission

Grâce aux études récentes sur les ESCRT-III, le mécanisme moléculaire de l'abscission, ainsi que la succession des sous-étapes de l'abscission, commencent à être bien compris : recrutement des ESCRT au midbody, formation de la structure conique d'ESCRT-III, coupure

des microtubules et fission de la membrane. En parallèle, les études sur la régulation temporelle de l'abscission montrent que les ESCRT-III sont également au cœur de la régulation dans le temps de l'abscission. De façon remarquable, toutes les régulations temporelles décrites jusqu'à ce jour reposent sur les ESCRT : retard de l'abscission *via* AuroraB et CHMP4C lorsqu'un pont d'ADN est présent dans le pont intercellulaire, inhibition de l'abscission des cellules spermatiques *via* TEX14 et Cep55, contrôle de l'abscission par Plk1 qui régule le recrutement de Cep55 au midbody. Les résultats de mes travaux montrent que la régulation dans le temps de l'abscission par la tension dans le pont intercellulaire s'effectue également *via* les ESCRT. Une tension dans le pont retarde le recrutement des ESCRT-III au midbody ainsi que la formation de la structure hélicoïdale finale, inhibant l'abscission. A l'inverse, une relâche de tension au niveau d'un pont mature (ESCRT-III déjà recrutés au midbody) lève l'inhibition par la tension et induit la formation de l'hélice finale d'ESCRT-III. Ainsi, mes travaux s'inscrivent dans la continuité des études réalisées jusqu'à présent et renforcent le rôle central des ESCRT-III dans l'abscission.

Conclusion générale

Grâce à une approche interdisciplinaire combinant des techniques de biologie cellulaire, de vidéomicroscopie, de microfabrication, et de biophysique, il a été possible d'étudier le rôle des forces exercées par les cellules filles lors de la cytocinèse. Notamment, il a été essentiel d'adapter des techniques généralement utilisées sur des cellules en interphase à l'étude de la cytocinèse, comme par exemple la technique de « Traction Force Microscopy ». De plus, le suivi en vidéomicroscopie de l'intégralité de la cytocinèse, bien qu'ajoutant de nombreuses difficultés, a permis d'étudier l'aspect temporel de la régulation de l'abscission.

Les résultats de mes travaux de recherche ont permis de proposer une interprétation nouvelle du rôle des forces exercées entre les cellules filles lors de la cytocinèse. En effet, je propose ici, à l'inverse de ce qui a été suggéré jusqu'à présent, qu'une tension au niveau du pont intercellulaire retarde l'abscission alors qu'une relâche de cette tension induit l'abscission. De plus, ce mécanisme implique les complexes ESCRT dont le rôle central dans l'abscission a été démontré au cours de ces cinq dernières années, renforçant l'intérêt de mes résultats. La caractérisation de la régulation temporelle de l'abscission par l'environnement des cellules filles ouvre des portes vers l'étude de la fonction du pont intercellulaire, encore mystérieuse aujourd'hui. En particulier, il sera intéressant d'étudier en détail les conséquences d'une rupture prématurée du pont sur l'intégrité d'un tissu ou sur le développement embryonnaire, systèmes dans lesquels l'influence de l'environnement extracellulaire est essentielle.

Références

Thèses :

Marion Ghibaudo, 2008
Influence des propriétés mécaniques du substrat sur la migration et l'adhésion cellulaire

Jenny Fink, 2009
Mechanotransduction in mitotic spindle positionning - Role of external forces and mechanical cortex properties

Sabrina Simões, 2011
Roles of the Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRTs) in the biogenesis of lysosome related organelles

Daphné Dambournet, 2011
Remodelage des lipides et de l'actine-F au cours des étapes finales de la division cellulaire - Rôle de la GTPase Rab35 et de son effecteur OCRL, une PI(4,5)P2 phosphatase impliquée dans le syndrome de Lowe

Articles scientifiques :

Amano M., Ito M., Kimura K., Fukata Y., Chihara K., Kakano T., Matsuura Y. & Kaibuchi K. (1996). Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). *The Journal of biological chemistry*, 271, p.20246-20249.

Andreassen P.R., Lohez O.D., Lacroix B & Margolis R.L. (2001). Tetraploid State Induces p53-dependent Arrest of Nontransformed Mammalian Cells in G1. *Molecular biology of the cell*, 12, p.1315-1328.

Azioune A., Storch M., Bornens Michel, Théry Manuel & Piel Matthieu (2009). Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab on a chip*, 9, p.1640-2.

Babst M., Wendland B., Estepa E.J. & Emr S.D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *The EMBO journal*, 17, p.2982-2993.

Bacia K., Schwille P. & Kurzchalia T. (2005). Sterol structure determines the separation of phases and the curvature of the liquid-ordered phase in model membranes. *PNAS*, 102.

Bansal D. & Campbell K.P. (2004). Dysferlin and the plasma membrane repair in muscular dystrophy. *Trends in cell biology*, 14, p.206-13.

Barr F.A., Elliott P.R. & Gruneberg U. (2011). Protein phosphatases and the regulation of mitosis. *Journal of cell science*, 124, p.2323-34.

Barr F.A., Silljé H.H.W. & Nigg E.A. (2004). Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5.

Bastos R.N. & Barr F. a (2010). Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *The Journal of cell biology*, 191, p.751-60.

Batchelder E.L., Hollopeter G., Campillo C., Mezanges X., Jorgensen E.M., Nassoy P., Sens P. & Plastino J. (2011). Membrane tension regulates motility by controlling lamellipodium organization. *PNAS*, 108, p.11429-34.

Baum B. & Georgiou M. (2011). Dynamics of adherens junctions in epithelial establishment, maintenance, and remodeling. *The Journal of Cell Biology*, 192, p.907-917.

Baumgart T., Hess S.T. & Webb W.W. (2003). Imaging coexisting fluid domains in biomembrane models coupling curvature and line tension. *Nature*, 425, p.23-26.

Beams H.W., Evans T.C., Breeman V. van & Baker W.W. (1950). Electron Microscope Studies on Structure of Mitotic Figure. *Proc Soc Exp Biol Med*, 74, p.717-20.

Bellairs R. & Bancroft M. (1975). Midbodies and beaded threads. *American Journal of Anatomy*, 143, p.393-8.

Benink H.A. & Bement W.M. (2005). Concentric zones of active RhoA and Cdc42 around single cell wounds. *The Journal of cell biology*, 168, p.429-39.

Betz T., Lenz M., Joanny J.-F. & Sykes Cécile (2009). ATP-dependent mechanics of red blood cells. *PNAS*, 106, p.15320-15325.

Biron D., Libros P., Sagi D., Mirelman D. & Moses E. (2001). "Midwives" assist dividing amoebae. *Nature*, 410, p.430-431.

Bischofberger M., Gonzalez M.R. & Goot F.G. van der (2009). Membrane injury by pore-forming proteins. *Current opinion in cell biology*, 21, p.589-595.

Bluemink J.G. & Laat S.W. de (1973). New membrane formation during cytokinesis in normal and cytochalasin B-treated eggs of Xenopus laevis. I. Electron microscope observations. *The Journal of cell biology*, 59, p.89-108.

Bouter A., Gounou C., Bérat R., Tan S., Gallois B., Granier T., Langlois d'Estaintot B., Pöschl E., Brachvogel B. & Brisson A.R. (2011). Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nature Communications*, 2.

Buck R.C. & Tisdale J.M. (1962). The fine structure of the mid-body of the rat erythroblast. *Journal of cell biology*, p.109-115.

Burkholder T.J. (2008). Mechanotransduction in skeletal muscle. *Frontiers in Bioscience*, 12, p.174-191.

Burton K. & Taylor D.L. (1997). Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature*, 385, p.450-454.

Byers B. & Abramson D.H. (1968). Cytokinesis in HeLa: post-telophase delay and microtubule-associated motility. *Protoplasma*, 66, p.413-35.

Böttcher R.T., Wiesner S., Braun A., Wimmer R., Berna A., Elad N., Medalia O., Pfeifer A., Aszódi A., Costell M. & Fässler R. (2009). Profilin 1 is required for abscission during late cytokinesis of chondrocytes. *The EMBO journal*, 28, p.1157-69.

Caneparo L., Pantazis P., Dempsey W. & Fraser S.E. (2011). Intercellular bridges in vertebrate gastrulation. *PloS one*, 6, p.e20230.

Canman J.C., Lewellyn L., Laband K., Smerdon S.J., Desai A., Bowerman B. & Oegema Karen (2008). Inhibition of Rac by the GAP activity of centralspindlin is essential for cytokinesis. *Science (New York, N.Y.)*, 322, p.1543-6.

Carlton J. G., Caballe A., Agromayor M., Kloc M. & Martin-Serrano J. (2012). ESCRT-III Governs the Aurora B-Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Science*, 220.

Carlton Jez G & Martin-Serrano Juan (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*, 316, p.1908-12.

Carlton Jeremy G, Caballe Anna, Agromayor Monica, Kloc Magdalena & Martin- J. (2012). ESCRT-III Governs the Aurora B – Mediated Abscission Checkpoint Through CHMP4C. *Cancer*, p.1-6.

Carreno S., Kouranti I., Glusman E.S., Fuller M.T. & Echard A. (2006). Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. , p.1-8.

Cascone I., Selimoglu R., Ozdemir C., Nery E. Del, Yeaman C., White M. & Camonis J. (2008). Distinct roles of RalA and RalB in the progression of cytokinesis are supported by distinct RalGEFs. *The EMBO journal*, 27, p.2375-87.

Caudron F. & Barral Y. (2009). Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Developmental cell*, 16, p.493-506.

Chalamalasetty R.B., Hümmer S., Nigg E. a & Silljé H.H.W. (2006). Influence of human Ect2 depletion and overexpression on cleavage furrow formation and abscission. *Journal of cell science*, 119, p.3008-19.

Chan C.S. & Botstein D. (1993). Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast. *Genetics*, 135, p.677-91.

Chang F, Drubin D. & Nurse P. (1997). cdc12p, a Protein Required for Cytokinesis in Fission Yeast, Is a Component of the Cell Division Ring and Interacts With Profilin. *The Journal of cell biology*, 137, p.169-82.

Cheeseman I.M. & Desai A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9, p.33-46.

Chen C. S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G. M. & Ingber D. E. (1997). Geometric Control of Cell Life and Death. *Science*, 276, p.1425-1428.

Chen Christopher S (2008). Mechanotransduction - a field pulling together? *Journal of cell science*, 121, p.3285-92.

Chen Q. & Pollard T.D. (2011). Actin filament severing by Cofilin is more important for assembly than constriction of the cytokinetic contractile ring. *The Journal of cell biology*, 195, p.485-498.

Chen X.-W., Inoue M., Hsu S.C. & Saltiel A.R. (2006). RalA-exocyst-dependent recycling endosome trafficking is required for the completion of cytokinesis. *The Journal of biological chemistry*, 281, p.38609-16.

Chu Y.-shiu, Thomas W.A., Eder O., Pincet F., Perez E., Thiery J.P. & Dufour S. (2004). Force measurements in E-cadherin–mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rac and Cdc42. *The Journal of cell biology*, 167, p.1183-1194.

Connell J.W., Lindon C., Luzio J.P. & Reid E. (2009). Spastin couples microtubule severing to membrane traffic in completion of cytokinesis and secretion. *Traffic*, 10, p.42-56.

Cramer L. & Mitchison T J (1993). Moving and stationary actin filaments are involved in spreading of postmitotic PtK2 cells. *The Journal of cell biology*, 122, p.833-43.

Cramer L.P. & Mitchison T J (1997). Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding. *Molecular biology of the cell*, 8, p.109-19.

Cramer L.P. & Mitchison T J (1995). Myosin is involved in postmitotic cell spreading. *The Journal of cell biology*, 131, p.179-89.

Dai J., Ting-beall H.P. & Sheetz M.P. (1997). The Secretion-coupled Endocytosis Correlates with Membrane Tension Changes in RBL 2H3 Cells. *The Journal of General Physiology*, 110, p.1-10.

Dambournet D., Machicoane M., Chesneau L., Sachse M., Rocancourt M., El Marjou A., Formstecher E., Salomon R., Goud B. & Echard A. (2011). Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nature cell biology*, 13, p.1-10.

Dao V.T., Dupuy A.G., Gavet O., Caron E. & Gunzburg J. de (2009). Dynamic changes in Rap1 activity are required for cell retraction and spreading during mitosis. *Journal of cell science*, 122, p.2996-3004.

Darenfed H. & Mandato C.A. (2005). Wound-induced contractile ring a model for cytokinesis. *Biochemistry and cell biology*, 83, p.711-20.

Dembo Micah & Wang Y.-li (1999). Stresses at the Cell-to-Substrate Interface during Locomotion of Fibroblasts. *Biophysical Journal*, 76, p.2307-2316.

DerMardirossian C., Schnelzer A. & Bokoch Gary M (2004). Phosphorylation of RhoGDI by Pak1 mediates dissociation of Rac GTPase. *Molecular cell*, 15, p.117-27.

Devreotes P. & Janetopoulos C. (2003). Eukaryotic chemotaxis: distinctions between directional sensing and polarization. *The Journal of biological chemistry*, 278, p.20445-8.

Dobbelaere J. & Barral Y. (2004). Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science*, 305, p.393-6.

Dubreuil V., Marzesco A.-marie, Corbeil D., Huttner W.B. & Wilsch-Bräuninger M. (2007). Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *The Journal of Cell Biology*, 176, p.483-495.

Dupont S., Morsut L., Aragona M., Enzo E., Giulitti S., Cordenonsi M., Zanconato F., Digabel J.L., Forcato M., Bicciato S., Elvassore N. & Piccolo S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474, p.179-183.

D'Avino P.P. & Glover D.M. (2009). Cytokinesis: mind the GAP. *Nature cell biology News and Views*, 11, p.112-114.

Echard A. (2008). Membrane traffic and polarization of lipid domains during cytokinesis. *Biochemical Society transactions*, 36, p.395-9.

Echard A., Hickson Gilles R X, Foley E. & O'Farrell P.H. (2004). Terminal Cytokinesis Events Uncovered after an RNAi Screen. *Current Biology*, 14, p.1685-1693.

Effler J.C., Iglesias P.A. & Robinson D.N. (2007). A Mechanosensory System Controls Cell Shape Changes During Mitotis. *Cell Cycle*, 6, p.30-35.

Eggert U.S., Kiger A.A., Richter C., Perlman Z.E., Perrimon N., Mitchison Timothy J & Field C.M. (2004). Parallel Chemical Genetic and Genome-Wide RNAi Screens Identify Cytokinesis Inhibitors and Targets. *PLoS biology*, 2.

Elad N., Abramovitch S., Sabanay H. & Medalia O. (2011). Microtubule organization in the final stages of cytokinesis as revealed by cryo-electron tomography. *Journal of Cell Science*, 1, p.207-215.

Elia N., Fabrikant G., Kozlov M.M. & Lippincott-schwartz J. (2012). Computational Model of Cytokinetic Abscission Driven by ESCRT-III Polymerization and Remodeling. *Biophysical journal*, 102, p.2309-2320.

Elia N., Sougrat R., Spurlin T. a, Hurley J.H. & Lippincott-Schwartz J. (2011). Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *PNAS*, p.1-6.

Emoto K, Inadome H., Kanaho Y., Narumiya S & Umeda M (2005). Local Change in Phospholipid Composition at the Cleavage Furrow Is Essential for Completion of Cytokinesis. *The Journal of biological chemistry*, 280, p.37901-37907.

Emoto Kazuo & Umeda Masato (2000). An Essential Role for a Membrane Lipid in Cytokinesis Regulation of Contractile Ring Disassembly by Redistribution of Phosphatidylethanolamine. *Journal of cell biology*, 149, p.1215-1224.

Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L. & Discher D.E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126, p.677-689.

Erlandson R.A. & Harven E. de (1971). The ultrastructure of synchronized HeLa cells. *Journal of Cell Science*, 8, p.353-397.

Errico A., Ballabio A. & Rugarli E.I. (2002). Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Human molecular genetics*, 11, p.153-63.

Estey M.P., Ciano-Oliveira C. Di, Froese C.D., Bejide M.T. & Trimble W.S. (2010). Distinct roles of septins in cytokinesis: SEPT9 mediates midbody abscission. *The Journal of cell biology*.

Ettinger A.W., Lohmann A., Karbanová J., Corbeil D., Hyman A.A. & Huttner W.B. (2011). Proliferating versus differentiating stem cells and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nature Communications*, 2, p.503-12.

Field S.J., Madson N., Kerr M.L., Galbraith K. a a, Kennedy C.E., Tahiliani M., Wilkins A. & Cantley L.C. (2005). PtdIns(4,5)P2 functions at the cleavage furrow during cytokinesis. *Current biology*, 15, p.1407-12.

Fielding A.B., Schonteich E., Matheson J., Wilson G., Yu X., Hickson Gilles R X, Srivastava S., Baldwin S. a, Prekeris R. & Gould G.W. (2005). Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *The EMBO journal*, 24, p.3389-99.

Fink J., Carpi N., Betz T., Bétard A., Chebah M., Azioune A., Bornens Michel, Sykes Cecile, Fetler L., Cuvelier D. & Piel Matthieu (2011). External forces control mitotic spindle positioning. *Nature cell biology*, 13, p.771-8.

Fujiwara K., Porter M.E. & Pollard T.D. (1978). Alpha-actinin localization in the cleavage furrow during cytokinesis. *Journal of cell biology*, 79.

Fyfe I., Schuh A.L., Edwardson J.M. & Audhya A. (2011). Association of ESCRT-II with VPS20 generates a curvature sensitive protein complex capable of nucleating filaments of ESCRT-III. *The Journal of biological chemistry*, 286, p.34262-34270.

Gai M., Camera P., Dema A., Bianchi F., Berto G., Scarpa E., Germana G. & Cunto F. Di (2011). Citron kinase controls abscission through RhoA and anillin. *Molecular Biology of the Cell*, p.3768-3778.

Gauthier N.C., Fardin M.A., Roca-cusachs P. & Sheetz M.P. (2011). Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *PNAS*, 108, p.14467-14472.

Geddis A.E. & Kaushansky K. (2006). Endomitotic Megakaryocytes Form a Midzone in Anaphase but have a Deficiency in Cleavage Furrow Formation. *Cell Cycle*, 5, p.538-545.

Ghazi-tabatabai S., Saksena S., Short J.M., Pobbati A.V., Veprintsev D.B., Crowther R.A., Emr S.D., Egelman E.H. & Williams R.L. (2008). Structure and Disassembly of Filaments Formed by the ESCRT-III Subunit Vps24. *Structure*, 2, p.1345-1356.

Giet R & Prigent C (1999). Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. *Journal of cell science*, 112, p.3591-601.

Glotzer M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science*, 307, p.1735-9.

Greenbaum M.P., Ma Lang & Matzuk M.M. (2007). Conversion of midbodies into germ cell intercellular bridges. *Developmental biology*, 305, p.389-96.

Greenbaum M.P., Yan W., Wu M.-H., Lin Y.-N., Agno J.E., Sharma M., Braun R.E., Rajkovic A. & Matzuk M.M. (2006). TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *PNAS*, 103, p.4982-7.

Gromley A., Jurczyk A., Sillibourne J., Halilovic E., Mogensen M., Groisman I., Blomberg M. & Doxsey S. (2003). A novel human protein of the maternal centriole is required for the final stages of cytokinesis and entry into S phase. *The Journal of cell biology*, 161, p.535-545.

Gromley A., Yeaman C., Rosa J., Redick S., Chen C.-T., Mirabelle S., Guha M., Sillibourne J. & Doxsey S.J. (2005). Centriolin anchoring of exocyst and SNARE complexes at the midbody is required for secretory-vesicle-mediated abscission. *Cell*, 123, p.75-87.

Gruneberg U., Neef R., Honda R., Nigg E. a & Barr F. a (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *The Journal of cell biology*, 166, p.167-72.

Gruneberg U., Neef R., Li Xiuling, Chan E.H.Y., Chalamalasetty R.B., Nigg E.A. & Barr F.A. (2006). KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *The Journal of Cell Biology*, 172.

Guertin D.A., Trautmann S. & Mccollum D. (2002). Cytokinesis in Eukaryotes. , 66.

Guizetti J. & Gerlich D.W. (2012). ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. *Trends in Cell Biology*, 22, p.133-40.

Guizetti J., Schermelleh L., Mäntler J., Maar S., Poser I., Leonhardt H., Müller-Reichert T. & Gerlich D.W. (2011). Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science*, 331, p.1616-20.

Gupta S. (2000). Hepatic polyploidy and liver growth control. *Seminars in Cancer Biology*, 10, p.161-171.

Guse A., Mishima M. & Glotzer M. (2005). Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Current biology : CB*, 15, p.778-86.

Hanson P.I., Roth R., Lin Y. & Heuser J.E. (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *The Journal of cell biology*, 180, p.389-402.

Harris A.K., Wild P. & Stopak D. (1980). Silicone Rubber Substrata : A New Wrinkle in the Study of Cell Locomotion. *Science*, 208, p.177-179.

Hartwell L.H. & Weinert T. a (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science (New York, N.Y.)*, 246, p.629-34.

Hazan J., Fonknechten N., Mavel D., Paternotte C., Samson D., Artiguenave F., Davoine C.S., Cruaud C., Dürr a, Wincker P., Brottier P., Cattolico L., Barbe V., Burgunder J.M., Prud'homme J.F., Brice a, Fontaine B., Heilig B. & Weissenbach J. (1999). Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nature genetics*, 23, p.296-303.

He B. & Guo W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Current opinion in cell biology*, 21, p.537-42.

Hirano A. & Kurimura T. (1974). Virally transformed cells and cytochalasin B I. The effect of cytochalasin B on cytokinesis, karyokinesis and DNA synthesis in cells. *Experimental cell research*, 89, p.111-120.

Hochegger H., Takeda S. & Hunt T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions : does one fit all ? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9.

Houk A.R., Jilkine A., Mejean C.O., Boltyanskiy R., Dufresne E.R., Angenent S.B., Altschuler S.J., Wu L.F. & Weiner O.D. (2012). Membrane Tension Maintains Cell Polarity by Confining Signals to the Leading Edge during Neutrophil Migration. *Cell*, 148, p.175-188.

Hu C.-kuo, Coughlin M. & Mitchison Timothy J (2012). Midbody Assembly and its Regulation during Cytokinesis. *Molecular biology of the cell*, 23, p.1024-1034.

Hyman A. (1989). Centrosome movement in the early divisions of Caenorhabditis elegans: a cortical site determining centrosome position. *The Journal of Cell Biology*, 109, p.1185-1193.

Hümmer S. & Mayer T.U. (2009). Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Current biology : CB*, 19, p.607-12.

Iwamori T., Iwamori N., Ma Lang, Edson M. a, Greenbaum M.P. & Matzuk M.M. (2010). TEX14 interacts with CEP55 to block cell abscission. *Molecular and cellular biology*, 30, p.2280-92.

Jaalouk D.E. & Lammerding J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10, p.63-73.

Janetopoulos C., Borleis J., Vazquez F., Iijima M. & Devreotes P. (2005). Temporal and spatial regulation of phosphoinositide signaling mediates cytokinesis. *Developmental cell*, 8, p.467-77.

Janke C., Rogowski K. & Dijk J. van (2008). Polyglutamylation: a fine-regulator of protein function? *EMBO reports*, 9, p.636-41.

Janson M.E., Dood M.E. de & Dogterom M. (2003). Dynamic instability of microtubules is regulated by force. *The Journal of cell biology*, 161, p.1029-34.

Jiang X., Bruzewicz D. a, Wong A.P., Piel Matthieu & Whitesides George M (2005). Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *PNAS*, 102, p.975-8.

Joo E., Tsang C.W. & Trimble W.S. (2005). Septins: traffic control at the cytokinesis intersection. *Traffic*, 6, p.626-34.

Julian M., Tollon Y., Moisand A., Mazarguil H., Puget A. & Wright M. (1993). Gamma-Tubulin participates in the formation of the midbody during cytokinesis in mammalian cells. *Journal of cell science*, 156, p.145-156.

Kageyama T. (1988). The occurrence of elongated intercellular bridges in deep cells of Oryzias embryos during blastula and gastrula stages. *Journal of Experimental Zoology*, 248, p.306-314.

Kaitna S., Mendoza M., Jantsch-Plunger V. & Glotzer M. (2000). Incenp and an Aurora-like kinase form a complex essential for chromosome segregation and efficient completion of cytokinesis. *Current Biology*, 10, p.1172-1181.

Kasahara K., Nakayama Y., Nakazato Y., Ikeda K., Kuga T. & Yamaguchi N. (2007). Src Signaling Regulates Completion of Abscission in Cytokinesis through ERK/MAPK Activation at the Midbody. *The Journal of biological chemistry*, 282, p.5327-5339.

Kechad A., Jananji S., Ruella Y. & Hickson Gilles R.X. (2012). Anillin Acts as a Bifunctional Linker Coordinating Midbody Ring Biogenesis during Cytokinesis. *Current Biology*, 22, p.197-203.

Khodjakov A. & Pines J. (2010). Centromere tensiona divisive issue. *Nature Cell biology Perspectives*, 12, p.919-923.

Kim M.S., Froese C.D., Estey M.P. & Trimble W.S. (2011). SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *Journal of cell biology*, 195.

Kosako H., Yoshida T., Matsumura F., Ishizaki T., Narumiya S & Inagaki M (2000). Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene*, 19, p.6059-64.

Kouranti I., Sachse M., Arouche N., Goud B. & Echard A. (2006). Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Current biology*, 16, p.1719-25.

Kraynov V.S., Chamberlain C., Bokoch G. M., Schwartz M.A., Slabaugh S. & Hahn K. M. (2000). Localized Rac Activation Dynamics Visualized in Living Cells. *Science*, 290, p.333-337.

Krishan A. & Buck R.C. (1965). Structure of the Mitotic Spindle in L Strain Fibroblasts. *The Journal of cell biology*, 24, p.433-444.

Krystal G., Rattner J.B. & Hamkalo B.A. (1978). Partial purification and characterization of the intercellular bridge from cultured mouse cells. *PNAS*, 75, p.4977-4981.

Kuo T.-chun, Chen C.-ting, Baron D., Onder T.T., Loewer S., Almeida S., Weismann C.M., Xu P., Houghton J.-marie, Gao F.-biao, Daley G.Q. & Doxsey S. (2011). Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nature Cell Biology*, 13, p.1214-1223.

Kurasawa Y., Earnshaw W.C., Mochizuki Y., Dohmae N. & Todokoro K. (2004). Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *The EMBO journal*, 23, p.3237-48.

Lacroix Benjamin, Dijk J. van, Gold N.D., Guizetti J., Aldrian-Herrada G., Rogowski K., Gerlich D.W. & Janke C. (2010). Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing. *The Journal of cell biology*, 189, p.945-54.

Lacroix Benjamin & Maddox A.S. (2012). Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. *The Journal of pathology*, 226, p.338-51.

Lampson M.A. & Cheeseman I.M. (2011). Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends in Cell Biology*, 21, p.133-140.

Larkin K. & Danilchik M.V. (1999). Microtubules are required for completion of cytokinesis in sea urchin eggs. *Developmental biology*, 214, p.215-26.

Lecuit T. & Wieschaus E. (2000). Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the Drosophila embryo. *The Journal of cell biology*, 150, p.849-60.

Lee H.H., Elia N., Ghirlando R., Lippincott-Schwartz J. & Hurley J.H. (2008). Midbody targeting of the ESCRT machinery by a noncanonical coiled coil in CEP55. *Science*, 322, p.576-80.

Lenz M., Crow D.J.G. & Joanny J.-F. (2009). Membrane Buckling Induced by Curved Filaments. *Physical Review Letters*, 038101, p.1-4.

Lenz M., Morlot S. & Roux A. (2009). Mechanical requirements for membrane fission: Common facts from various examples. *FEBS Letters*, 583, p.3839-3846.

Li R. & Murray A.W. (1991). Feedback Control of Mitosis in Budding Yeast. *Cell*, 66, p.519-517.

Liu D., Vader G., Vromans M.J.M., Lampson M. a & Lens S.M. a (2009). Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science*, 323, p.1350-3.

Liu D., Vleugel M., Backer C.B., Hori T., Fukagawa T., Cheeseman I.M. & Lampson M. a (2010). Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *The Journal of cell biology*, 188, p.809-20.

Liu J., Fairn G.D., Ceccarelli D.F., Sicheri F. & Wilde A. (2012). Cleavage Furrow Organization Requires PIP2 -Mediated Recruitment of Anillin. *Current Biology*, 22, p.64-69.

Lo C.-min, Wang H.-bei, Dembo Micah & Wang Y.-li (2000). Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate. *Biophysical Journal*, 79, p.144-152.

Low S.H., Li Xin, Miura M., Kudo N., Quiñones B. & Weimbs T. (2003). Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells. *Developmental cell*, 4, p.753-9.

Ludwig T., Kirmse R., Poole K. & Schwarz U.S. (2008). Probing cellular microenvironments and tissue remodeling by atomic force microscopy. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 456, p.29-49.

Martin P. & Wood W. (2002). Epithelial fusions in the embryo. *Current opinion in cell biology*, 14, p.569-574.

Maruthamuthu V., Sabass B., Schwarz U.S. & Gardel M.L. (2011). Cell-ECM traction force modulates endogenous tension at cell-cell contacts. *PNAS*, 108, p.4708-13.

Maskarinec S. a, Franck C., Tirrell D. a & Ravichandran G. (2009). Quantifying cellular traction forces in three dimensions. *PNAS*, 106, p.22108-13.

Matzke R., Jacobson K. & Radmacher M. (2001). Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nature cell biology*, 3, p.607-610.

McBeath R., Pirone D.M., Nelson C.M., Bhadriraju K. & Chen Christopher S (2004). Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental cell*, 6, p.483-495.

McNally F.J. & Vale R D (1993). Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell*, 75, p.419-29.

McNeil P.L. & Kirchhausen T. (2005). An emergency response team for membrane repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6, p.499-505.

Merrifield C.J., Perrais D. & Zenisek D. (2005). Coupling between Clathrin-Coated-Pit Invagination, Cortactin Recruitment, and Membrane Scission Observed in Live Cells. *Cell*, 121, p.593-606.

Miller A.L. & Bement W.M. (2009). Regulation of cytokinesis by Rho GTPase flux. *Nature cell biology*, 11, p.71-7.

Minoshima Y., Kawashima T., Hirose K., Tonozuka Y., Kawajiri A., Bao Y.C., Deng X., Tatsuka M., Narumiya Shuh, May W.S., Nosaka T., Semba K., Inoue T., Satoh T., Inagaki Masaki & Kitamura T. (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Developmental cell*, 4, p.549-60.

Mishima M., Kaitna S. & Glotzer M. (2002). Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Developmental cell*, 2, p.41-54.

Mishima M., Pavicic V., Grüneberg U., Nigg E. & Glotzer M. (2004). Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature*, 430.

Mollinari C., Kleman J.-P., Jiang W., Schoehn G., Hunter T. & Margolis R.L. (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *The Journal of cell biology*, 157, p.1175-86.

Montagnac G., Echard A. & Chavrier P. (2008). Endocytic traffic in animal cell cytokinesis. *Current opinion in cell biology*, 20, p.454-61.

Morin P., Flors C. & Olson M.F. (2009). Constitutively active RhoA inhibits proliferation by retarding G(1) to S phase cell cycle progression and impairing cytokinesis. *European journal of cell biology*, 88, p.495-507.

Morita E., Colf L. a, Karren M.A., Sandrin V., Rodesch C.K. & Sundquist W.I. (2010). Human ESCRT-III and VPS4 proteins are required for centrosome and spindle maintenance. *PNAS*, 107, p.12889-94.

Morita E., Sandrin V., Chung H.-Y., Morham S.G., Gygi S.P., Rodesch C.K. & Sundquist W.I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *The EMBO journal*, 26, p.4215-27.

Mostowy S. & Cossart P. (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13, p.183-194.

Mukherjee C., Majumder S. & Lohia A. (2009). Inter-cellular variation in DNA content of Entamoeba histolytica originates from temporal and spatial uncoupling of cytokinesis from the nuclear cycle. *PLoS neglected tropical diseases*, 3, p.e409.

Mullins I.M. & Mclntosh J.R. (1982). Isolation and Initial Characterization of the Mammalian Midbody Morphology of the Isolated Midbodies. *The Journal of cell biology*, 94, p.654-661.

Mullins J.M. & Biesele J.J. (1977). Terminal phase of cytokinesis in D-98S cells. *The Journal of Cell Biology*, 73, p.672-684.

Munevar S., Wang Y & Dembo M (2001). Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophysical journal*, 80, p.1744-57.

Na S., Collin O., Chowdhury F., Tay B., Ouyang M., Wang Yingxiao & Wang N. (2008). Rapid signal transduction in living cells is a unique feature of mechanotransduction. *PNAS*, 105, p.6626-6631.

Neef R., Gruneberg U., Kopajtich R., Li Xiuling, Nigg E.A., Sillje H. & Barr F.A. (2007). Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nature cell biology*, 9.

Nelson C.M., Jean R.P., Tan J.L., Liu W.F., Sniadecki N.J., Spector A.A. & Chen Christopher S (2005). Emergent patterns of growth controlled by multicellular form and mechanics. *PNAS*, 102, p.11594-11599.

Neto H. & Gould G.W. (2011). The regulation of abscission by multi-protein complexes. *Journal of cell science*, 5, p.3199-3207.

Ng M.M., Chang Fred & Burgess David R (2005). Movement of Membrane Domains and Requirement of Membrane Signaling Molecules for Cytokinesis. *Developmental Cell*, 9, p.781-790.

Nicklas R.B. & Koch C. a (1969). Chromosome micromanipulation. 3. Spindle fiber tension and the reorientation of mal-oriented chromosomes. *The Journal of cell biology*, 43, p.40-50.

Nicklas R.B. & Ward S.C. (1994). Elements of error correction in mitosis: microtubule capture, release, and tension. *The Journal of cell biology*, 126, p.1241-53.

Norden C., Mendoza M., Dobbelaere J., Kotwaliwale C.V., Biggins S. & Barral Y. (2006). The NoCut pathway links completion of cytokinesis to spindle midzone function to prevent chromosome breakage. *Cell*, 125, p.85-98.

Odde D.J., Ma L, Briggs a H., DeMarco A. & Kirschner M W (1999). Microtubule bending and breaking in living fibroblast cells. *Journal of cell science*, 112, p.3283-8.

Pellinen T., Tuomi S., Arjonen A., Wolf M., Edgren H., Meyer H., Grosse R., Kitzing T., Rantala J.K., Kallioniemi O., Fässler R., Kallio M. & Ivaska J. (2008). Integrin trafficking regulated by Rab21 is necessary for cytokinesis. *Developmental cell*, 15, p.371-85.

Petronczki M. & Uhlmann F. (2012). ESCRTing DNA at the Cleavage Site During Cytokinesis. *Science - Perspectives*, 336, p.166-167.

Piekny A.J. & Glotzer M. (2008). Anillin Is a Scaffold Protein That Links RhoA, Actin, and Myosin during Cytokinesis. *Current Biology*, p.30-36.

Piekny A.J. & Maddox A.S. (2010). The myriad roles of Anillin during cytokinesis. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21, p.881-891.

Piel M., Nordberg J., Euteneuer U. & Bornens M. (2001). Centrosome-Dependent Exit of Cytokinesis in Animal Cells. *Science*, 291, p.1550-1553.

Piperno G., LeDizet M. & Chang X.-jia (1987). Microtubules Contraining Acetylated alpha-Tubulin in Mammalian Cells in Culture. *The Journal of cell biology*, 104, p.289-302.

Pitaval A., Tseng Q., Bornens Michel & Théry Manuel (2010). Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *The Journal of cell biology*, 191, p.303-12.

Pohl C. & Jentsch S. (2008). Final stages of cytokinesis and midbody ring formation are controlled by BRUCE. *Cell*, 132, p.832-45.

Pohl C. & Jentsch S. (2009). Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis. *Nature cell biology*, 11, p.65-70.

Pollard T.D. & Wu J.-Q. (2010). Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, p.149-155.

Rannou Y., Salaun P., Benaud C., Khan J., Dutertre S., Giet Régis & Prigent Claude (2012). Mnk1 kinase activity is required for abscission. *Journal of cell science*.

Raucher D. & Sheetz M.P. (2000). Cell Spreading and Lamellipodial Extension Rate Is Regulated by Membrane Tension. *The Journal of cell biology*, 148, p.127-136.

Raucher D. & Sheetz M.P. (1999). Membrane Expansion Increases Endocytosis Rate during Mitosis. *The Journal of cell biology*, 144, p.497-506.

Reverte C.G., Benware A., Jones C.W. & LaFlamme S.E. (2006). Perturbing integrin function inhibits microtubule growth from centrosomes, spindle assembly, and cytokinesis. *The Journal of cell biology*, 174, p.491-7.

Robbins E. & Gonatas N.K. (1964). The ultrastructure of a mammalian cell during the mitotic cycle. *The Journal of Cell Biology*, p.429-63.

Robinson D.N., Cant K. & Cooley L. (1994). Morphogenesis of Drosophila ovarian ring canals. *Development*, 120, p.2015-2025.

Roll-Mecak A. & Vale Ronald D (2008). Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature*, 451, p.363-7.

Rosa J., Canovas P., Islam A., Altieri D.C. & Doxsey S.J. (2006). Survivin Modulates Microtubule Dynamics and Nucleation throughout the Cell Cycle. *Molecular Biology of the Cell*, 17, p.1483-1493.

Rottner K., Hall A. & Small J.V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Current biology*, 9, p.640-8.

Roubinet C., Decelle B., Chicanne G., Dorn J.F., Payrastre B., Payre F. & Carreno S. (2011). Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *The Journal of Cell Biology*, 195, p.99-112.

Roure O., Saez A., Buguin A., Austin R.H., Chavrier P., Silberzan P. & Ladoux B. (2005). Force mapping in epithelial cell migration. *PNAS*, 102, p.2390-2395.

Roux A., Cuvelier D., Nassoy P., Prost J., Bassereau P. & Goud B. (2005). Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *The EMBO journal*, 24, p.1537-1545.

Roux A., Uyhazi K., Frost A. & Camilli P. De (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature*, 441, p.528-31.

Roxrud I., Stenmark H. & Malerød L. (2010). ESCRT & Co. *Biology of the cell*, 102, p.293-318.

Sabass B., Gardel M.L., Waterman C.M. & Schwarz U.S. (2008). High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances. *Biophysical journal*, 94, p.207-20.

Sampath S.C., Ohi R., Leismann O., Salic A., Pozniakovski A. & Funabiki H. (2004). The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell*, 118, p.187-202.

Samson R.Y., Obita T., Hodgson B., Shaw M.K., Chong P.L.-gau, Williams R.L. & Bell S.D. (2011). Molecular and Structural Basis of ESCRT-III Recruitment to Membranes during Archaeal Cell Division. *Molecular Cell*, 41, p.186-196.

Sanger J.M., Pochapin M.B. & Sanger J.W. (1985). Midbody sealing after cytokinesis in embryos of the sea urchin Arabacia punctulata. *Cell and tissue research*, 240, p.287-92.

Schiel J.A., Park K., Morphew M.K., Reid E., Hoenger A. & Prekeris R. (2011). Endocytic membrane fusion and buckling-induced microtubule severing mediate cell abscission. *Journal of cell science*, 124, p.1411-24.

Schiel J.A. & Prekeris R. (2011). ESCRT or endosomes ? *Communicative & integrative biology*, 4, p.606-608.

Schulze E.S. & Blose S.H. (1984). Passage of molecules across the intercellular bridge between post-mitotic daughter cells. *Experimental Cell Research*, 151, p.367-373.

Schumacher J.M., Golden a & Donovan P.J. (1998). AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in Caenorhabditis elegans embryos. *The Journal of cell biology*, 143, p.1635-46.

Schwedler U.K.V., Stuchell M., Mu B., Ward D.M., Chung H.-young, Morita E., Wang H.E., Davis T., He G.-ping, Cimbora D.M., Scott A., Kra H.-georg, Kaplan J., Morham S.G. & Sundquist W.I. (2003). The Protein Network of HIV Budding. *Cell*, 114, p.701-713.

Sedzinski J., Biro M., Oswald A., Tinevez J.-Y., Salbreux G. & Paluch E. (2011). Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature*, 476, p.462-466.

Shafikhani S.H., Mostov K. & Engel J. (2008). Focal adhesion components are essential for mammalian cell cytokinesis. *Cell Cycle*, 7, p.2868-2876.

Sharp D.J. & Ross J.L. (2012). Microtubule-severing enzymes at the cutting edge. *Journal of cell science*, 125.

Sheetz M.P. & Dai J. (1996). Modulation of membrane dynamics and cell motility by membrane tension. *Trends in cell biology*, 6, p.85-89.

Shu H.B., Li Z., Palacios M.J., Li Q. & Joshi H.C. (1995). A transient association of gamma-tubulin at the midbody is required for the completion of cytokinesis during the mammalian cell division. *Journal of cell science*, 108 (Pt 9, p.2955-62.

Shuster C.B. & Burgess D R (2002). Targeted new membrane addition in the cleavage furrow is a late, separate event in cytokinesis. *PNAS*, 99, p.3633-8.

Simon G.C. & Prekeris R. (2008). Mechanisms regulating targeting of recycling endosomes to the cleavage furrow during cytokinesis. *Biochemical Society transactions*, 36, p.391-4.

Simon G.C., Schonteich E., Wu C.C., Piekny A., Yu X., Gould G.W., Glotzer M. & Prekeris R. (2008). Sequential Cyk-4 binding to ECT2 and FIP3 regulates cleavage furrow ingression and abscission during cytokinesis. *EMBO Journal*, 27, p.1791-1803.

Sinha B., Köster D., Ruez R., Gonnord P., Bastiani M., Abankwa D., Stan R.V., Butler-Browne G., Vedie B., Johannes L., Morone N., Parton R.G., Raposo G., Sens P., Lamaze C. & Nassoy P. (2011). Cells Respond to Mechanical Stress by Rapid Disassembly of Caveolae. *Cell*, 144, p.402-413.

Skop A.R., Liu H., Yates J., Meyer B.J. & Heald R. (2004). Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms. *Science*, 305, p.61-6.

Smith T.C., Fang Z. & Luna E.J. (2011). Novel Interactors and a Role for Supervillin in Early Cytokinesis. *Cytosqueleton*, 67, p.346-364.

Somers W.G. & Saint R. (2003). A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis. *Developmental cell*, 4, p.29-39.

Speliotes E.K., Uren a, Vaux D. & Horvitz H.R. (2000). The survivin-like C. elegans BIR-1 protein acts with the Aurora-like kinase AIR-2 to affect chromosomes and the spindle midzone. *Molecular cell*, 6, p.211-23.

Spitzer C., Schellmann S., Sabovljevic A., Shahriari M., Keshavaiah C., Bechtold N., Herzog M., Müller S., Hanisch F.-georg & Hülskamp M. (2006). The Arabidopsis elch mutant reveals functions of an ESCRT component in cytokinesis. *Development*, 133, p.4679-4689.

Steigemann P., Wurzenberger C., Schmitz M.H. a, Held M., Guizetti J., Maar S. & Gerlich D.W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell*, 136, p.473-84.

Su K.-C., Takaki T. & Petronczki Mark (2011). Targeting of the RhoGEF Ect2 to the Equatorial Membrane Controls Cleavage Furrow Formation during Cytokinesis. *Developmental Cell*, 21, p.1104-1115.

Sudo H. & Baas P.W. (2010). Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts. *The Journal of neuroscience*, 30, p.7215-26.

Sudo H. & Maru Y. (2007). LAPSER1 is a putative cytokinetic tumor suppressor that shows the same centrosome and midbody subcellular localization pattern as p80 katanin. *The FASEB journal*, 21, p.2086-100.

Sönnichsen B., Koski L.B., Walsh A., Marschall P., Neumann B., Brehm M., Alleaume A.-M., Artelt J., Bettencourt P., Cassin E., Hewitson M., Holz C., Khan M., Lazik S., Martin C., Nitzsche B., Ruer M., Stamford J., Winzi M., Heinkel R., Röder M., Finell J., Häntsch H., Jones S.J.M., Jones M., Piano F., Gunsalus K.C., Oegema K, Gönczy P., Coulson A., Hyma A.A. & Echeverri C.J. (2005). Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in Caenorhabditis elegans. *Nature*, 434.

Tan J.L., Tien J., Pirone D.M., Gray D.S., Bhadriraju K. & Chen Christopher S (2003). Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *PNAS*, 100, p.1484-9.

Tatsumoto T., Xie X., Blumenthal R., Okamoto I. & Miki T. (1999). Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2 M phases, and involved in cytokinesis. *Journal of cell biology*, 147, p.921-927.

Tawk M., Araya C., Lyons D. a, Reugels A.M., Girdler G.C., Bayley P.R., Hyde D.R., Tada M. & Clarke J.D.W. (2007). A mirror-symmetric cell division that orchestrates neuroepithelial morphogenesis. *Nature*, 446, p.797-800.

Théry Manuel & Bornens Michel (2006). Cell shape and cell division. *Current opinion in cell biology*, 18, p.648-57.

Théry M., Pépin A., Dressaire E., Chen Y. & Bornens M. (2006). Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell motility and the cytoskeletonotil Cytoskeleton*, 63, p.341-355.

Théry Manuel (2010). Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *Journal of Cell Science*, 123, p.4201-4213.

Théry Manuel, Racine V., Piel Matthieu, Pépin Anne, Dimitrov A., Chen Yong, Sibarita J.-B. & Bornens Michel (2006). Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity. *PNAS*, 103, p.19771-6.

Théry Manuel, Racine V., Pépin Anne, Piel Matthieu, Chen Yong, Sibarita J.-B. & Bornens Michel (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nature cell biology*, 7, p.947-53.

Torsoni A.S., Marin T.M., Velloso L.A. & Franchini K.G. (2005). RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, 289, p.H1488-H1496.

Tseng Q., Wang I., Duchemin-Pelletier E., Azioune A., Carpi N., Gao J., Filhol O., Piel Matthieu, Théry Manuel & Balland M. (2011). A new micropatterning method of soft substrates reveals that different tumorigenic signals can promote or reduce cell contraction levels. *Lab on a chip*, 11, p.2231-40.

Uyeda T.Q.P. & Nagasaki A. (2004). Variations on a theme: the many modes of cytokinesis. *Current opinion in cell biology*, 16, p.55-60.

Waal M.S. Van der, Hengeveld R.C.C., Horst A. van der & Lens S.M. a (2012). Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Experimental cell research*, p.1-14.

Wang N., Tytell J.D. & Ingber Donald E (2009). Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10, p.75-82.

Watanabe N., Madaule P., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Kakizuka a, Saito Y., Nakao K., Jockusch B.M. & Narumiya S (1997). p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *The EMBO journal*, 16, p.3044-56.

Waterman-Storer C.M. & Salmon E.D. (1997). Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *The Journal of cell biology*, 139, p.417-34.

Weiner O.D., Neilsen P.O., Prestwich G.D., Kirschner Marc W, Cantley L.C. & Bourne H.R. (2002). A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nature cell biology*, 4, p.509-13.

Wilson G.M., Fielding A.B., Simon G.C., Yu X., Andrews P.D., Hames R.S., Frey A.M., Peden A. a, Gould G.W. & Prekeris R. (2005). The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Molecular biology of the cell*, 16, p.849-60.

Wollert T., Wunder C., Lippincott-Schwartz J. & Hurley J.H. (2009). Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 458, p.172-7.

Wozniak M. a & Chen Christopher S (2009). Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10, p.34-43.

Wozniak M.A., Desai R., Solski P.A., Der C.J. & Keely P.J. (2003). ROCK-generated contractility regulates breast physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *The Journal of cell biology*, 163, p.583-595.

Wu Y.I., Frey D., Lungu O.I., Jaehrig A., Schlichting I., Kuhlman B. & Hahn Klaus M (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature*, 461, p.104-8.

Yang D., Rismanchi N., Renvoisé B., Lippincott-Schwartz J., Blackstone C. & Hurley J.H. (2008). Structural basis for midbody targeting of spastin by the ESCRT-III protein CHMP1B. *Nature structural & molecular biology*, 15, p.1278-86.

Yoo S.K., Deng Q., Cavnar P.J., Wu Y.I., Hahn Klaus M & Huttenlocher A. (2010). Differential regulation of protrusion and polarity by PI3K during neutrophil motility in live zebrafish. *Developmental cell*, 18, p.226-36.

Yoshigi M., Hoffman L.M., Jensen C.C., Yost H.J. & Beckerle M.C. (2005). Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *The Journal of cell biology*, 171, p.209-215.

Yoshizaki H., Ohba Y., Kurokawa K., Itoh R.E., Nakamura T., Mochizuki N., Nagashima K. & Matsuda M. (2003). Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *The Journal of cell biology*, 162, p.223-32.

Zhao W.-meng, Seki A. & Fang G. (2006). Cep55, a Microtubule-bundling Protein, Associates with Centralspindlin to Control the Midbody Integrity and Cell Abscission during Cytokinesis. *Molecular biology of the cell*, 17, p.3881-3896.

Annexes

I. Protocoles détaillés

1. Vidéomicroscopie de la division cellulaire

Live imaging of cell division

Materials:

- Glass-bottom dish 35mm diameter: WPI FluoroDish FD35-100
- Fibronectin 50 µg/ml in PBS: Sigma F1141
- Hela Kyoto cells α-tubulin-GFP Histone2B-mCherry: generated in Daniel Gerlich's lab
- Cell culture medium: DMEM Glutamax (Gibco 31966-047) + 10% FCS + 1% PenStrep (Gibco 15140)
- Live cell imaging medium: Leibovitz's L-15 (Gibco 21083-027) + 10% FCS + 1% PenStrep

Fibronectin coating:

- Put a 100 µl drop of Fibronectin solution in a glass-bottom dish.
- Cover with a parafilm: cut a little disk of parafilm and spread the drop with it.
- Incubate 1h at room temperature. Avoid evaporation with a wet tissue paper.
- Add 2 ml of PBS, remove the floating parafilm.
- Under the cell culture hood : wash 3 times with PBS and one time with cell culture medium. Keep the dish with cell culture medium in the incubator until using it.

Cells plating:

- Use cells at 50-80% confluence that have been cultured for 1 to 3 days without selecting antibiotics (0.3 µg/ml Puromycin and 0.5 mg/ml Geneticin to keep the selection for the routine).
- After washing with PBS, detach the cells with trypsine.
- Centrifuge and resuspend the cells at a concentration of 50 000 cells/ml.
- Remove the medium of the glass-bottom dish and add 2 ml of cell solution.

- Let the cells spread at least 4h. Adjust the quantity of cells if you want to image them the day after.

Before imaging:

- Change the cell culture medium to live cell imaging medium (Leibovitz's L-15). This avoids the autofluorescence of the medium (no phenol red) and allow the use of a videomicroscope without CO2 incubation (CO2 independent medium). Here you can wash the cells once or twice with Leibovitz's before adding 2 ml of Leibovitz's. This will remove the dead floating cells and the dusts.
- Seal the dish with parafilm to avoid evaporation during the long-term imaging without humidification. Be sure that there is no parafilm under the dish to have a perfectly flat dish.
- Use a tissue paper to clean carefully the bottom of the dish with water then 70% ethanol, then dry it.

Live imaging:

For this part, refer to the videomicroscope guidelines to set the parameters.

- Turn on the videomicroscope at least 4h before the beginning of your experiment to let the system equilibrate. Ideally, the temperature control should be always at 37°C.
- Fix your dishes in the videomicroscope. Be sure that the dishes are clean, flat and well fixed. If you use a short-working-distance objective, be sure that the holder will not crash against the stage during the multi-well acquisition. If any doubt, use a Z-offset for each change of well.
- Use a dry 20X objective 0.75 NA DIC. Use a Phase objective only if you really need the phase contrast (DIC objectives offer better fluorescence quality).
- Use binning 2x2 if the resolution of binning 1x1 is not required: you will illuminate less the cells and the data will be 4 times lighter.
- Use a laser-based autofocus to correct the Z-drift of the plate.
- Use a Z-offset to focus on the interphasic cells or on the spindle (higher).
- Record your positions-list. The maximum number of positions will be determined by the speed of the microscope and the timelapse between 2 timepoints.
- Set up the fluorescent illuminations (GFP and mCherry) to have enough signal but not too much: the major problem is phototoxicity, so the less you illuminate the cells the better the cells will behave. The transmitted light can be informative even without the Phase contrast.

- Image for 20-24h with a timelapse of 3 to 5 min depending of the time resolution you want.

2. Transfection (plasmides) et vidéomicroscopie

Plasmid Transfection for Live Imaging with Lipofectamine LTX – Plus Reagent (Invitrogen)

A day before: Cells plating

- Plate the cells on 35 mm diameter glass-bottom dish coated with Fibronectin 50 µg/ml.
- Seed between 100 000 and 150 000 cells per dish. The amount of cells has to be adjusted regarding the toxicity of the transfection.

In the morning: Plasmid Transfection

- Change the cell culture medium to medium without FCS and without PenStrep.
- For 1 dish, prepare:
- 1.25 µg of DNA in 250 µl of medium without FCS and without PenStrep
- Add 1.25 µl of Plus Reagent
- Incubate 5 min at room temperature
- Add 3.125 µl of Lipofectamine LTX
- Incubate 30 min at room temperature
- Add the mix to the cells drop by drop then swirl the plate.
- Incubate 2h in the cell culture incubator.
- Change the medium to regular medium (with FCS and PenStrep).

NOTE: these conditions are already half of the recommended doses in order to decrease the over-expression of the construction and thus the toxicity. You can even decrease it more; in that case, prepare the same solution with DNA, Plus Reagent and Lipofectamine LTX, but add less of this solution on the cells. Keep at least 2h of incublation.

At the end of the day: Live imaging

- Change the cell culture medium to Leibovitz's L-15.
- Seal the dish with parafilm and clean the bottom of the dish.
- Image the cells using a videomicroscope at the end of the day. Tipically, the recording can be started 6 to 8 hours after the beginning of the transfection. This allow to follow

the beginning of plasmid expression (usually after a mitosis because the nuclear envelope has been broken and constructions are in the nucleus), useful in case of toxicity at high level of expression.

3. Transfection (siRNA) et vidéomicroscopie

siRNA Transfection for Live Imaging with Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen)

Day 1: cells plating

- Plate the cells on 35 mm diameter glass-bottom dish coated with Fibronectin 50 µg/ml.
- Seed between 50 000 and 150 000 cells per dish. The amount of cells has to be adjusted regarding the toxicity of the siRNA to have enough cells at Day 4 but not too many.

Day 2: siRNA Transfection 1

- Change the cell culture medium to medium without FCS and without PenStrep.
- For 1 dish, prepare:
- 15 µl of siRNA (stock of siRNA at 20 µM) in 250 µl of medium without FCS and without PenStrep
- 5 µl of Lipofectamine RNAi Max in 250 µl of medium without FCS and without PenStrep
- Mix the two and incubate at room temperature 10 to 20 min
- Add the mix (500 µl) to the cells drop by drop then swirl the plate.
- Incubate 4h in the cell culture incubator.
- Change the medium to regular medium (with FCS and PenStrep).

Day 3: siRNA Transfection 2

- Do the exact same protocol than Day 2.

Day 4: Live imaging

- Change the cell culture medium to Leibovitz's L-15.
- Seal the dish with parafilm.
- Clean the bottom of the dish.
- Image the cells.

NOTE 1: if cells are too confluent, one possibility is to re-plate them at Day 3 evening (after changing the medium for fresh complete cell culture medium) at lower density, let them spread overnight, and image them at Day 4.

NOTE 2: check the efficiency of depletion at Day 4 either by Western Blot or by qPCR.

4. Fabrication de lignées stables fluorescentes

Stable Cell Line Selection after Plasmid Transfection

Day 1: Cells plating

- Plate the cells in a plastic cell-culture-treated 6 wells plate. Start with at least 3 wells.
- Seed between 100 000 and 150 000 cells per dish. The amount of cells has to be adjusted regarding the toxicity of the transfection.

Day 2: Plasmid Transfection with Lipofectamine LTX – Plus Reagent (Invitrogen)

- Change the cell culture medium to medium without FCS and without PenStrep.
- For 1 dish, prepare:
- 2.5 µg of DNA in 500 µl of medium without FCS and without PenStrep
- Add 2.5 µl of Plus Reagent
- Incubate 5 min at room temperature
- Add 6.25 µl of Lipofectamine LTX
- Incubate 30 min at room temperature
- Add the mix to the cells drop by drop then swirl the plate.
- Incubate 4h in the cell culture incubator.
- Change the medium to regular medium (with FCS and PenStrep).
- NOTE: if the over-expression of the construction is too toxic, the amount of transfection material can be decreased. In that case, prepare the same solution with DNA, Plus Reagent and Lipofectamine LTX, but add less of this solution on the cells (250 or 125 µl per well).

Day 3: Antibiotic selection

- If fluorescence is visible under the microscope, start the selection with G418 or puromycin, or wait Day 4 to start the selection.
- G418 is usually used at 500 µg/ml, but can be used more concentrated to allow a better selection at the beginning of the process.

- Puromycin is used at 0,3 µg/ml, but can be very toxic on cells at the beginning of the selection. Check the cells every day and adjust the concentration of puromycin (0.3 or 0.2 µg/µl or nothing) to allow cells to recover for few days after a hard selection.
- Do 3 different selections in parallel in order to keep a backup and adjust the selection differently according the cell behavior.
- For double expression, make one selection at a time. For example, you want to make a stable cell line expressing construction A (antibiotic A for selection) and construction B (antibiotic B for selection). Start by transfecting the cells with construction A and do the full selection with antibiotic A. Once this first cell line is stable, transfect it with construction B and select with antibiotic B. When selecting for construction B, don't use antibiotic A on top of it at the beginning of the selection, it would be too toxic. Wait until the cell line is resistant to antibiotic B before using medium containing both A and B antibiotics.

FACS sorting

- Once the population is stable (antibiotics resistant), sort it by FACS as it can happen that cells become resistant to the antibiotics even without a stable integration of the plasmidic construction.

Sub-cloning

- After FACS sorting, if the population is still too heterogeneous to work with, do a sub-cloning of this population:
- Prepare a solution of cells at a concentration of 0.5 cell per well of a 96-well plate (flat bottom, suitable for fluorescence imaging). Usually, the wells can be filled by 250 µl: prepare a solution of 2 cells/ml. To obtain an accurate dilution, proceed by succession of intermediate dilutions. Let the cells spread and grow into clones.
- After a week, check the entire plate for wells with only a single clone of cells. If possible, check also the fluorescence to find the clones which are interesting.
- Let them grow until the cells in the center of the clone are very packed.
- Trypsinize the cells and plate them on a bigger surface, typically in a well of a 24-wells plate.
- Expand the clones until you have a good population.
- Check the best clones (2 or 3) with videomicroscopy, amplify and store.

NOTE: it is very useful to check the fluorescence of the cells regularly during the process of the selection. It will allow you to stop and start again the whole process if the fluorescent

constructions are lost, and it will save you a lot of time. If high resolution is needed, plate few cells on a dish and go under a good microscope.

5. Synchronisation par mitotic-shake-off

Cell synchronization by Mitotic shake-off

- Use a 300 cm² flask at 80% of confluence (ideally cells seeded 2 days before).
- 3 hours or overnight before the mitotic shake-off, do a preliminary washing step to remove dead cells and floating debris : wash 2 or 3 times the flask with 50 ml of warm and equilibrated cell culture medium (at least 1h in the incubator). If needed, hit gently the side of the flask to unstick the dead cells.
- Shake-off : hit twice each side of the flask on the edge of a table. Be careful to AVOID MAKING ANY BUBBLE that could dry out the cells.
- Check under the microscope that mitotic cells are detached and are now floating in the medium. Every mitotic cell should not be necessarily detached, but every floating cell should be in metaphase (use phase contrast to observe the metaphasic plate) or anaphase (doublet of cells).
- Harvest the 50 ml of cell culture medium containing the floating dividing cells.
- If needed, cells can be concentrated by centrifugation 2 min at 1200 rpm at 37°C. It is very important to heat the centrifuge to minimize the aggregation of the cells (during division, cells are very sensitive and have a strong tendency to aggregate).
- Resuspend the cell pellet with a P1000 pipette in warm and equilibrated medium.
- Do the desired dilution in warm and equilibrated medium, and plate the cells on the substrate. For a 6 wells-plate, use all the cells harvested: resuspend the pellet in 12 ml and seed 2 ml per well.

6. Fabrication des micro-motifs adhésifs sur verre par la méthode des UV et utilisation en vidéomicroscopie

Live cell imaging using micro-patterned glass coverslips produced by the deep UV light method

Specific materials :

- UV lamp 185 nm (UVO Cleaner)
- Plasma cleaner (Harrick)
- Synthetic Quartz mask with features (Toppan)
- Glass coverslips of 25 mm in diameter
- PLL(20)-g[3.5]-PEG(2): poly-L-lysine-g-poly(ethyleneglycol) (standard PLL-g-PEG from SurfaceSolutions GmbH, Zurich). Keep a stock solution at 1mg/mL in 10 mM Hepes pH 7.3 at 4°C, use at 0.1mg/mL in 10 mM Hepes pH 7.3.
- Fibronectin (Sigma F1141) 50 µg/ml in 100 mM NaHCO3 (pH 8.6)

Micro-patterning of the glass coverslips :

- Sonicate the coverslips in ethanol 100% for 5 minutes.
- Let them dry on a paper tissue or air dry them.
- Activate the coverslips 1 min with the plasma cleaner.
- Incubate 1h at room temperature with 0.1 mg/ml PLL-g-PEG in 10 mM Hepes pH 7.3 (drop of 100 µl on a parafilm). Avoid evaporation by using a humid chamber.
- Wash the coverslips twice 5 min in PBS then rinse them twice in water. Use a coverslips holder in big volumes of PBS or water, under agitation.
- Wash the mask with70% ethanol and a soft tissue. Wear GLOVES to avoid the deposition of grease on the mask. Be careful not to scratch the mask or to drop it (it is very fragile and breaks in many pieces).
- Activate the mask 3 min under deep UV (185 nm), chrome side (brown) facing the UV lamp.
- Let the mask cool down if heating during activation.
- Stick the coverslips on the mask with a 2.8 µl drop of water, PEG side facing the chrome side (brown). Use a plastic tip to press the coverslips against the mask to remove air

bubbles. The adhesion between the coverslip and the mask is essential to avoid the enlargement of the patterns. In order to avoid scratching the mask, NEVER USE METAL TWISERS.

- Illuminate 3 min the PEG side of the coverslips under the deep UV lamp trough the mask : place this time the silver side of the mask facing the lamp, with the coverslips underneath.
- Detach the coverslips by putting 5 ml of water on the mask and sometime by waiting 5 or 10 min. Forcing the detachment damages the PEG coating of the coverslips.
- Incubate 1h at room temperature the treated surface of the coverslips with a solution of 50 µg/ml Fibronectin in 100 mM $NaHCO_3$ (pH 8.6). Use a drop of 100 µl (enough to have a homogenous coating) on a parafilm and a humid chamber to avoid evaporation. Here fluorescent fibronectin or fluorescent fibrinogen (5 µg/ml) can be added to the fibronectin solution to make fluorescent patterns.
- Put the coverlips in a 6-wells-plate filled with PBS and go under a cell culture hood.

NOTE: the coverslips can be stored dry at 4°C after PEG coating for 1 month and after UV illumination for 1 or 2 weeks. Fibronectin coating is better fresh but can be done the day before (coverslips stored in PBS at 4°C).

Cells plating :

- Wash the coverslips with PBS, avoiding the dewetting of the coverslips to preserve the fibronectin coating : use addition of 25 ml of PBS on one side and aspiration at the same time on the other side (called the flushing technique).
- Replace the PBS by cell culture medium using the same flushing technique.
- Detach the cells using EDTA 0,02% and NOT trypsin (allow a better adhesion of the cells onto the micro-patterns). Wash twice the cells with PBS before EDTA incubation. Detachment can take as long as 15 min to occur.
- Centrifuge cells to get rid of the EDTA.
- Resuspend the cell pellet in 1 ml of warm and equilibrated medium using a P1000 pipette to minimize the aggregation of the cells.
- Do the desired dilution in warm and equilibrated medium and plate the cells on the patterned coverslips in the 6-wells-plate (2 ml per well of the cell solution at the final concentration). Typically, seed 100000 to 200000 cells for a 25 mm coverslip, but number of cells has to be adapted in function of the shape of the patterns (decrease this number when using twin patterns for cytokinesis or when studding isolated cells on line). In order to avoid the concentration of the cells in the middle of the well, flow

slowly the cell solution on the border of the well and put the plate immediately in the incubator with minimum movement.

- After 20 min, check the cell attachment on the patterns. If cells are already attached to the patterns (not completely spread), wash the unattached cells with 25 ml of warm cell culture medium using the flushing technique.
- Let the cells spread on the patterns for at least 3 hours (depending on the cell type and on the shape of the patterns).

Live cell imaging :

- To image these patterned coverslips, 2 techniques are used in the lab :
- Use a 6-wells-plate with holes in the wells and stick the patterned coverslips (PEG + UV) in the wells the day before. “MatTek” company is selling glass-bottom 6-wells-plates and can provide these plates with no glass-bottom. Use a silicon glue (aquarium type) to stick the patterned coverslips under the bottom of the wells (to allow multiposition acquisition without Z offset problems). Let the glue dry overnight in order to avoid cell toxicity. Before use, incubate the glass with fibronectine using a little piece of parafilm to spread the drop. Then use the 6-wells-plate as usual.
- Use a magnetic chamber to mount the coverslips. “Chamlide” compagny is providing a huge range of these magnetic chambers. Be careful of cleaning them very well : use soapy water, rince them, spray ethanol on it and dry them very well. Incubate the rubber overnight in cell culture medium in the incubator before use. Cells can be plated on the coverslips in a 6-wells-plate then mounted in the chamber just before use. Clean very well the glass bottom with water then ethanol after mounting.

7. Traction Force Microscopy au cours de la cytocinèse

Traction Force Microscopy and cytokinesis live imaging

Specific materials:

- Glass-bottom dish 35mm diameter: WPI FluoroDish FD35-100
- Silane APTMS (3-aminopropyltrimethoxysilane)
- Glutaraldéhyde 0.5% in PBS
- Solution of Acrylamide 40% (BioRad)
- Solution of Bis-acrylamide 2% (BioRad)
- 0.2 µm beads fluorescence dark red (660/680) (Invitrogen F8807)
- APS (ammonium persulfate 10%), less than one week old !!!
- TEMED
- Sulfo-SANPAH (Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitophenylamino) hexanoate)

Polyacrylamide Gels for TFM:

- Use a cell culture glass-bottom dish 35 mm diameter
- Activate 1 min in a plasma chamber (without the lid)
- Incubate 5 min with 100 µl of APTMS (3-aminopropyltrimethoxysilane) under the chemical hood
- Wash it very well with water, first with a wash bottle then in a bath under agitation in a big volume of water
- Incubate 30 min with 400 µl of Glutaraldéhyde 0.5% in PBS
- Wash again very well with water (wash bottle and bath)
- Dry the surface with compressed air or let it dry
- Put a drop of 9 µl of polyacrylamide solution (see next paragraph) on the glass then spread the drop with a coverslip of 18 mm diameter previously washed with ethanol and dried
- Let it polymerize 30 to 45 min
- Incubate 10 to 15 min in PBS then remove the coverslip
- Wash the surface of the gel with a wash bottle of PBS

- Add 200 µl of Sulfo-SANPAH (Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitophenylamino) hexanoate) 1 mM in PBS. It must be dark red.
- Illuminate 1 min under UV. It must be brown.
- Rince it very well with a wash bottle of PBS
- Do the Sulfo-SANPAH treatment a second time
- After intensive washing with PBS, incubate overnight with 500 µl of Fibronectin 25 µg/ml in PBS
- Rince 3 times under the cell culture hood with sterile PBS then with cell culture media
- Plate the cells at the desired confluence (relatively low in order to have isolated cells, better for forces calculation). Cells may need 12h (overnight is good) to fully spread on the surface.

Preparation of Polyacrylamide Solution:

- Use 0.2 µm beads fluorescence dark red (660/680) (Molecular Probe, FluoSphere)
- Sonicate 3 min (not more !) in a little bath cleaner an aliquot of your bead solution
- Prepare the pre-mix with (volumes for 250 µl):
- PBS: qsp 250 µl
- Beads: 2 µl
- Acrylamide: 46.88 µl (5 kPa) or 31.25 µl (2 kPa)
- Bis-acrylamide: 7.5 µl (5 kPa) or 12.5 µl (2 kPa)
- Sonicate again 3 min this pre-mix
- Just before use, add APS (ammonium persulfate 10%) and Temed:
- APS: 2.5 µl
- Temed: 0.5 µl
- Vortex to homogenize then use immediately

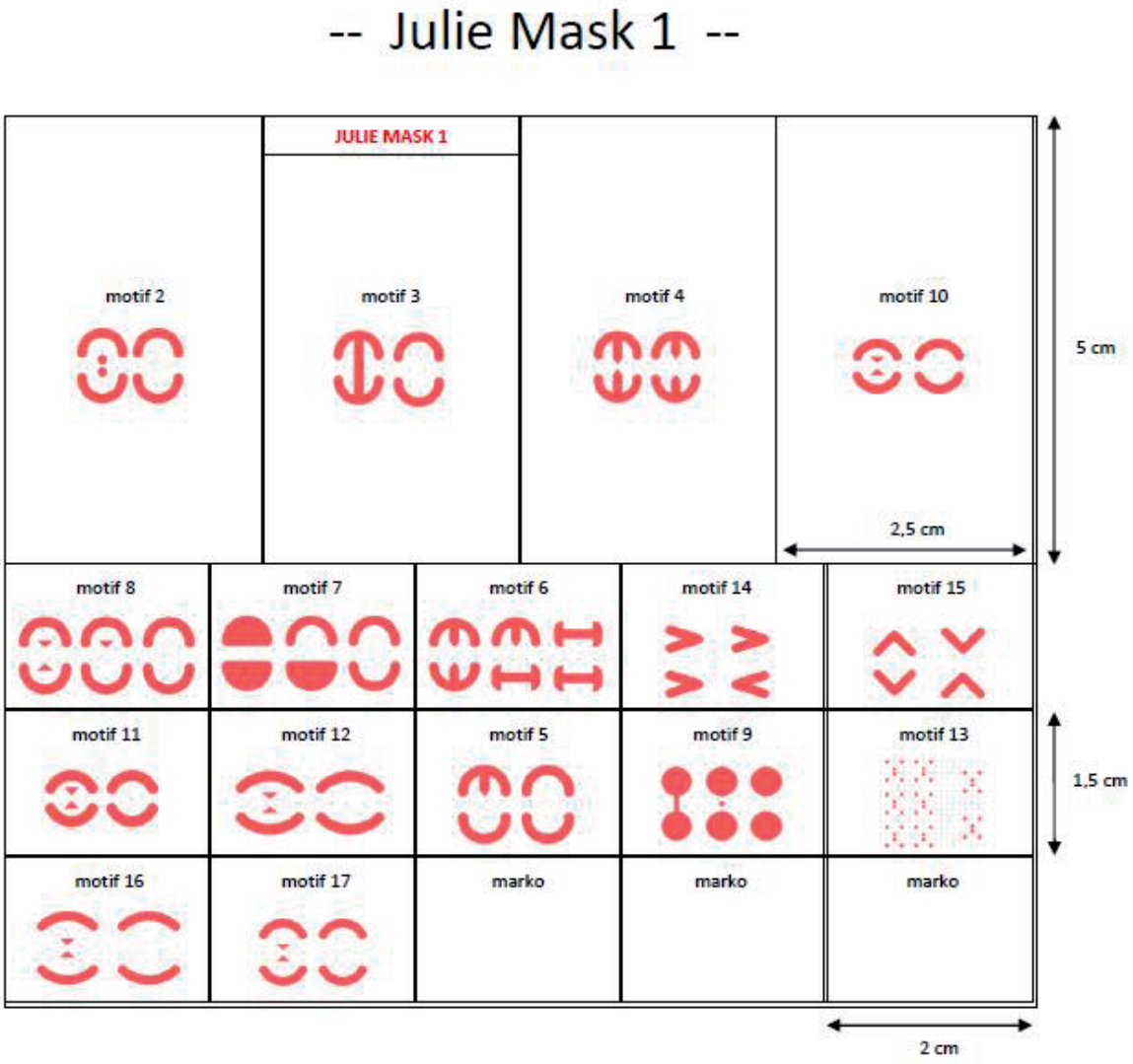
Live cell imaging of cytokinesis and TFM:

- Change the cell culture medium to live cell imaging medium (Leibovitz's L-15).
- Use a tissue paper to clean carefully the bottom of the dish with water then 70% ethanol, then dry it.
- Use a videomicroscope equipped with a 60x oil immersion, with humidification but no C02.

- A confocal microscope is not required, widefield microscopes are working very well for 2D TFM if objectives and cameras are good.
- Fix very well the bottom of the dish (with patafix or whatever, but it must be strongly fixed). Add the lid on the dish, but don't fix it (it must be easily removed).
- Adjust the focus on your cells, set the parameters of the imaging. Fluorescent channels for microtubules, DNA, beads and transmitted light. Do not use DIC and remove the DIC piece underneath the objective (it deforms the image of the beads). To decrease the phototoxicity, DNA fluorescence can be taken once every 3 or 4 timepoints (just to check DNA bridges). Z-stack of 1 µm step of about 10 to 15 planes must cover the interface between the gel and the cells, and if possible must reach the intercellular bridge to follow the cytokinesis. Timelapse can be adjusted, usually 4 or 5 minutes.
- For a multi-positions movie, find cells in metaphase using either the 60x or a 10x (be careful not to touch the oil with the dry 10x). About 10 positions are enough (then the cells start to divide, and the timelapse is too short to allow more acquisitions).
- For each position, check that the thickness of the gel is at least 30 µm (find the top and bottom surfaces of the gel where beads are numerous).
- Once your positions are set up, check a last time the focus (using beads fluorescence of transmitted light) in order to have the Z-stack covering the surface of the gel. It allows a little shift in Z without totally losing the focus of the beads. Start the movie, for 3 to 5 hours depending on cells behavior.
- As usually infrared-laser-based autofocus (like the PFS of Nikon) don't work with the polyacrylamide gel, check regularly the focus and adjust it.
- Once the movie is finished, remove the lid of the dish, remove the medium with a P1000 pipette, add 2 ml of warm Trypsine, flush a little bit. BE CAREFUL NOT TO MOVE THE DISH to keep the same positions. Start again the movie to follow the detachment of the cells, and stop it when all the cells are completely detached. This will allow the imaging of the gel without any forces applied on it.
- The stacks over time of the beads can be reconstructed using the Metamorph function "chose best focus" in the "Review multi-dimensional acquisition": it chooses per timepoint the best Z-plane of the beads. It can also work for other channels, but usually it is more accurate by hand…
- Now you have everything acquired, good luck with the computation to calculate the forces !

II. Plans des masques optiques conçus

1. Masque 1



Dimensions du masque : 11cm x 11cm

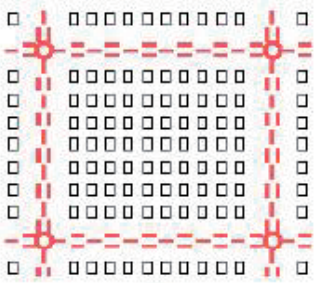
Frame : 10 X

Dimensions de base des motifs (2,3,4,8,7,6,5) :

ext-ext : 48 µm x 32 µm

ϕ ext des () : 16 µm

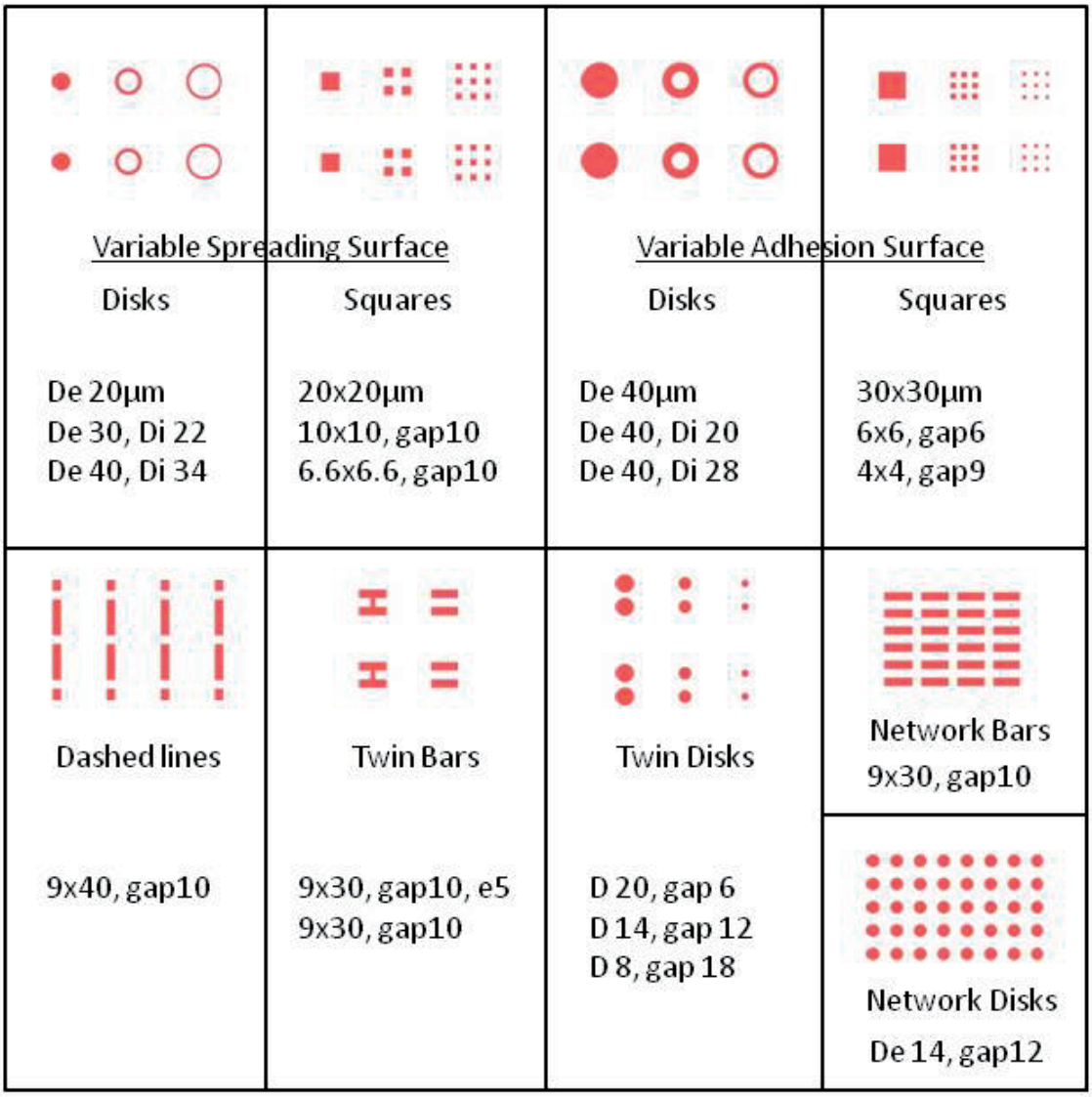
épaisseur : 6 µm



frame

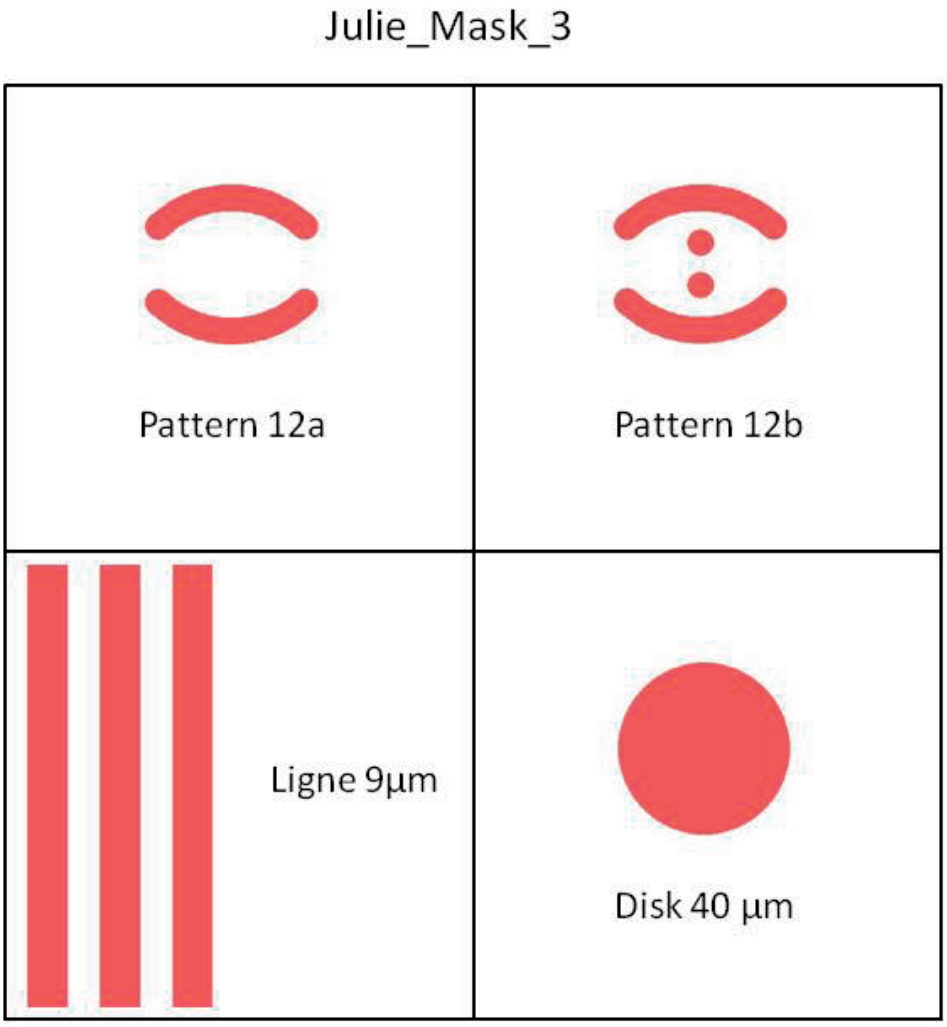
2. Masque 2

Julie_Mask_2

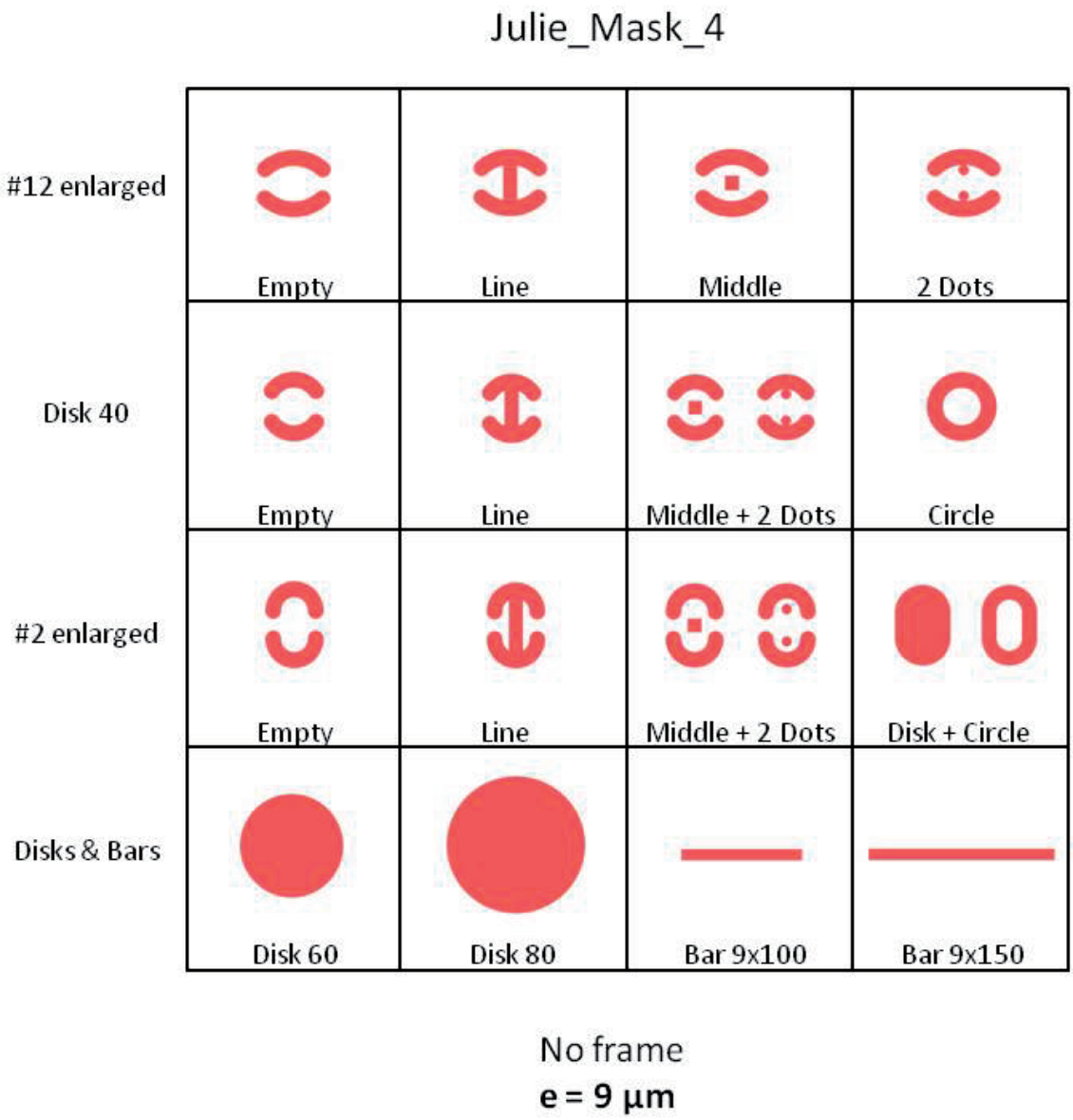


No frame
De = Diamètre extérieur
Di = Diamètre intérieur

3. Masque 3



4. Masque 4


Julie_Mask_4
#12 enlarged
Empty
Line
Middle
2 Dots
Disk 40
Empty
Line
Middle + 2 Dots
Circle
#2 enlarged
Empty
Line
Middle + 2 Dots
Disk + Circle
Disks & Bars
Disk 60
Disk 80
Bar 9x100
Bar 9x150
No frame
e = 9 µm

III. Autres articles publiés au cours de la thèse

2009 Maria Almonacid, James Moseley, **Julie Janvore**, Adeline Mayeux, Vincent Fraisier, Paul Nurse, Anne Paoletti (2009) "Spatial control of cytokinesis by Cdr2 kinase and Mid1/Anillin nuclear export", Current Biology *19*(11), 961-6.

2012 Stijn F. M. van Dongen, **Julie Janvore**, Sander S. van Berkel, Emmanuelle Marie, Matthieu Piel, Christophe Tribet (2012) "Reactive Protein-repellent Surfaces for the Straightforward Attachment of Small Molecules up to Whole Cells", Chemical Science, First published on the Web 05 Jul 2012.

Current Biology 19, 961–966, June 9, 2009 ©2009 Elsevier Ltd All rights reserved DOI 10.1016/j.cub.2009.04.024

Report

Spatial Control of Cytokinesis by Cdr2 Kinase and Mid1/Anillin Nuclear Export

Maria Almonacid,[1,2,4] James B. Moseley,[3,4] Julie Janvore,[1,2] Adeline Mayeux,[1,2] Vincent Fraisier,[1,2] Paul Nurse,[3] and Anne Paoletti[1,2,*]
[1]Institut Curie
Centre de Recherche
F-75248 Paris
France
[2]Centre National de la Recherche Scientifique
Unité mixte de recherche 144
F-75248 Paris
France
[3]The Rockefeller University
New York, NY 10065
USA

Summary

Maintaining genome integrity and cellular function requires proper positioning of the cell division plane. In most eukaryotes, cytokinesis relies on a contractile actomyosin ring positioned by intrinsic spatial signals that are poorly defined at the molecular level. Fission yeast cells assemble a medial contractile ring in response to positive spatial cues from the nucleus at the cell center [1, 2] and negative spatial cues from the cell tips [3, 4]. These signals control the localization of the anillin-like protein Mid1, which defines the position of the division plane at the medial cortex, where it recruits contractile-ring components at mitosis onset [5–10]. Here we show that Cdr2 kinase anchors Mid1 at the medial cortex during interphase through association with the Mid1 N terminus. This association underlies the negative regulation of Mid1 distribution by cell tips. We also demonstrate that the positive signaling from the nucleus is based on Mid1 nuclear export, which links division-plane position to nuclear position during early mitosis. After nuclear displacement, Mid1 nuclear export is dominant over Cdr2-dependent positioning of Mid1. We conclude that Cdr2- and nuclear export-dependent positioning of Mid1 constitute two overlapping mechanisms that relay cell polarity and nuclear positional information to ensure proper division-plane specification.

Results and Discussion

During interphase, Mid1 localizes to both the cell nucleus and a band of cortical nodes at the center of fission yeast cells [5, 7]. How Mid1 associates with the medial cortex remains unclear: the carboxy-terminal half of Mid1 (Mid1-Cter, residues 500–920) localizes to the central cortex through an amphipathic helix but does not complement positional defects of the division plane in *mid1*Δ cells, and mutation of the membrane-binding helix only slightly affects Mid1 function [11]. In contrast, the amino-terminal half of Mid1 (Mid1-Nter; residues 1–506) localizes to the medial cortex by an unknown mechanism and complements positional defects of the division plane in *mid1*Δ cells [11]. To investigate Mid1-Nter targeting to the medial cortex, we examined its localization in cells lacking Cdr2, a kinase that localizes to the medial cortex and promotes mitosis through negative regulation of Wee1 [12–14]. In *cdr2*Δ cells, Mid1-Nter localized to the cytoplasm and nucleus but not to the central cortex (Figure 1A; also Figure S1B, available online). This contrasts with Mid1-Cter, which localizes to the central cortex independently of Cdr2 (Figure S1C). Moreover, Mid1-Nter properly positioned the division plane in wild-type but not *cdr2*Δ cells (Figures 1A and 1B). These results indicate that the Cdr2 kinase is required for the localization and function of Mid1-Nter.

Despite its requirement for localization and function of Mid1-Nter, deletion of *cdr2* had a limited impact on the position of the division plane in the presence of full-length Mid1 (~20% abnormal septa in *cdr2*Δ cells expressing endogenous Mid1 or Mid1-GFP and ~40% in cells expressing Mid1-4GFP; Figures 1B and 3B; also Figure S5C). We tested whether the Mid1 C-terminal membrane-binding helix might contribute to Mid1 function in the absence of Mid1 N-terminal anchoring. Indeed, mutation of the membrane-binding helix (Helix*-Mid1) led to dramatic septation defects in *cdr2*Δ cells but not in wild-type cells (Figure 1B). Thus, impairing singly either Mid1 N-terminal anchoring or Mid1 C-terminal binding to membranes has little effect on Mid1 function, but combining these mutations leads to strong synthetic defects and loss of Mid1 function. This indicates that Mid1 association with Cdr2 is redundant with Mid1 C-terminal membrane binding in the promotion of Mid1 anchoring to the cortex and positioning of the division plane. Despite this redundancy, Mid1 localization to cortical nodes was disrupted in *cdr2*Δ cells during interphase. Mid1 localized almost exclusively in the nucleus and formed fewer cortical nodes during progression through G2, which correlates with cell length in fission yeast (Figures 1C and 1D). Thus, Cdr2 targets Mid1 to the medial cortex during interphase. A mutation predicted to abolish Cdr2 kinase activity (E177A) impaired Mid1 localization at the medial cortex (Figure S1A), although this mutation does not affect Cdr2 localization [14]. In addition, Mid1-Nter was absent from the medial cortex and did not position the division plane properly in *cdr2(E177A)* cells (Figure S1B), indicating a role for Cdr2 kinase activity in Mid1 association with medial cortical nodes.

To determine how Cdr2 controls Mid1-Nter anchoring to the medial cortex, we generated a panel of Mid1-Nter mutants by sequential deletion of gene segments encoding 50 amino acid stretches. Mid1-Nter Δ300-350 and Δ400-450 failed to localize to the central cortex and to position the division plane (Figures 2A and 2B) and thus mimicked the effects of *cdr2* deletion on Mid1-Nter. Supporting a key role for these domains in Mid1-Nter anchoring, a small polypeptide comprising Mid1 residues 300–450 also localized to central cortical nodes (Figure S2A), and its overexpression delocalized Mid1 from cortical nodes during interphase (Figure S2B). These results suggested that Mid1 300–350 or 400–450 may mediate Mid1 interaction with Cdr2. Consistent with this idea, Mid1 interacted physically with Cdr2 as assayed by

*Correspondence: paoletti@curie.fr
[4]These authors contributed equally to this work

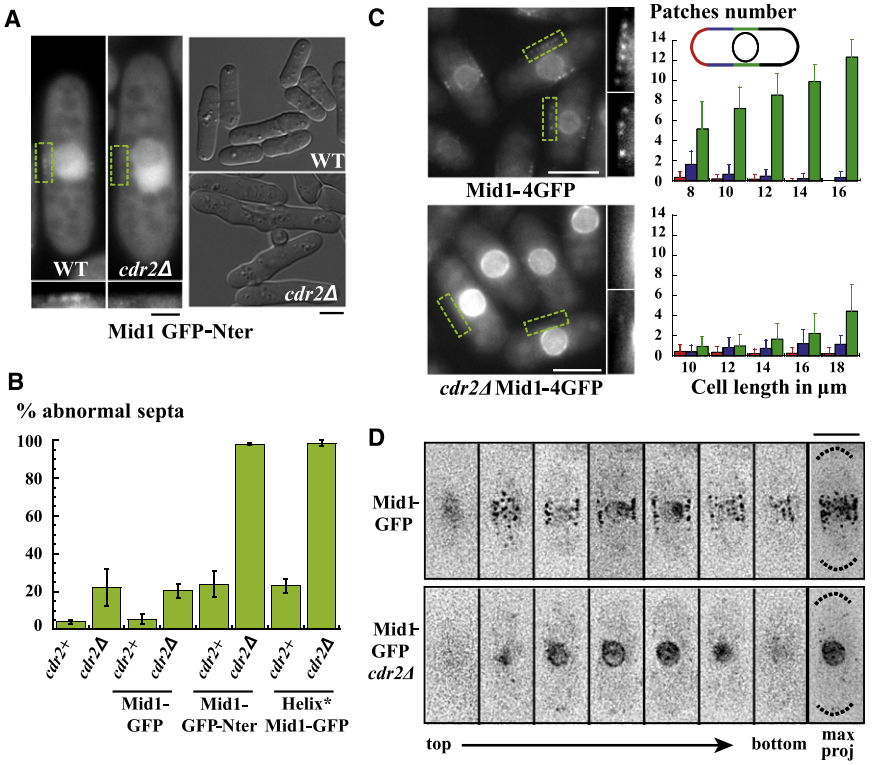


Figure 1. Cdr2 Anchors Mid1 at the Medial Cortex during Interphase through Interaction with Its Amino-Terminal Domain

(A) Left: localization of the Mid1 N terminus (GFP-Nter construct) in wild-type and *cdr2*Δ cells deleted for endogenous *mid1*. GFP-Nter medial patches are absent in *cdr2*Δ cells. The scale bar represents 2 μm. Insets correspond to magnified (2×) and contrast-enhanced views of green boxed regions. Right: DIC images of similar cells. Scale bars represent 5 μm.

(B) Percentage of displaced septa in *cdr2*Δ cells expressing endogenous Mid1 or deleted for endogenous *mid1* and expressing Mid1-GFP, GFP-Nter, or Helix* Mid1-GFP. Cells were grown at 30°C. Means ± SD (error bars) were calculated from six independent counts of 100 cells each.

(C) Localization of Mid1-4GFP in wild-type and *cdr2*Δ cells (left) and mean number of cortical patches (right) at the tip (red) and at the lateral (blue) and medial (green) cortex as shown in the scheme on top. Counts were made on the medial focal plane. Means ± SD (error bars) were calculated on 190–200 cells from two independent experiments. Scale bars represent 5 μm. Insets correspond to magnified (2×) and contrast-enhanced views of green boxed regions.

(D) Deconvolved z series and maximum projection of wild-type (top) and *cdr2*Δ cells (bottom) expressing Mid1-mEGFP. The scale bar represents 5 μm.

coimmunoprecipitation. This interaction was severely impaired upon deletion of amino acids 400–450 but not of amino acids 300–350 (Figure 2D). Moreover, similar to *cdr2* deletion, deletion of residues 400–450 strongly reduced localization of full-length Mid1 to the medial cortex (Figure 2C). These results suggest that residues 400–450 of Mid1 mediate association with Cdr2.

Similar to the Mid1 distribution defects in *cdr2*Δ cells, mislocalization of Mid1 Δ400–450 during interphase had little impact on division-plane positioning (Figure 2B). This suggested that Mid1 localization to the medial cortex might be restored in these mutants prior to ring assembly in early mitosis. Accordingly, preferential distribution of Mid1 at the medial cortex was observed in *cdr2*Δ or Mid1 Δ400–450 cells in late G2 (Figures 1C and 2C; 16- and 18-μm-long cells, corresponding to late G2 cells). This indicates that an alternative, Cdr2-independent mechanism promotes targeting of Mid1 to the medial cortex in late G2 when the Mid1-Cdr2 interaction is compromised.

When cells enter mitosis, Polo kinase (Plo1) triggers Mid1 export from the nucleus [15], and Mid1 is found exclusively at the medial cortical nodes, where it recruits cytokinesis proteins. These nodes then condense to form the contractile ring [5, 7, 9, 10, 15]. We hypothesized that Mid1 export from the nucleus might represent the Cdr2-independent mechanism of Mid1 targeting to the medial cortex. This predicts overlapping roles for Mid1 nuclear export and Cdr2 in specifying the division plane.

To test this prediction, we first combined *cdr2*Δ with the temperature-sensitive *plo1-1* allele that is defective in Mid1 nuclear export and displays misplaced septa at high temperatures (≥34°C) [15]. The *cdr2*Δ *plo1-1* double mutant showed synthetic defects in positioning the division plane; many cells displayed aberrant septa at lower temperatures (e.g., 29°C and 32°C; Figure S3). A similar result was obtained with *plo1-24C*, a different temperature-sensitive allele [15] (our unpublished observations). We also found synthetic defects between *plo1-1* and the Mid1Δ400–450 mutant, which impairs Cdr2-Mid1 interactions, indicating that these results are independent of Cdr2 effects on mitosis and cell size. These synthetic genetic interactions support overlapping roles for *cdr2* and *plo1* in regulating Mid1 function. However, a Mid1 mutant that localizes exclusively to the cell cortex but not to the nucleus (Mid1^{nsm}; see below for details) was also synthetic with *plo1-1*, suggesting that Plo1 may regulate additional aspects of Mid1 function beyond nuclear export.

To test the role of Mid1 nuclear export more directly, we combined a previously characterized mutation in the C-terminal basic nuclear localization signal [11] with deletion of an N-terminal nuclear import sequence (amino acids 450–506; Figure S2C) to generate a Mid1 nuclear shuttling mutant (Mid1^{nsm}) that cannot localize to the nucleus. Mid1^{nsm} was absent from the nucleus during all stages of the cell cycle (Figure 3A) and was not affected by treatment with the nuclear-export inhibitor leptomycin B (Figure S4A), demonstrating that it is completely deficient in nuclear shuttling. In wild-type cells, Mid1^{nsm} concentrated at the medial cortex during interphase and promoted contractile-ring assembly at the cell middle, similar to wild-type Mid1 (Figures 3A and 3B). In contrast, in *cdr2*Δ cells Mid1^{nsm} was not enriched at the cell middle during interphase and localized throughout the cell cortex, including at cell tips (Figure 3A; also Figure S4), indicating that negative regulation of Mid1 by cell tips [3, 4] requires Cdr2. These cells displayed a higher frequency of abnormal septa than Mid1^{nsm} or *cdr2*Δ single mutants (Figures 3A and 3B; also Figure S5C), suggesting contractile-ring defects. Therefore, we next observed contractile-ring assembly in these mutants by time-lapse video microscopy (Figures 3C and 3D). In the Mid1^{nsm} single mutant, myosin II was recruited to a confined central region and

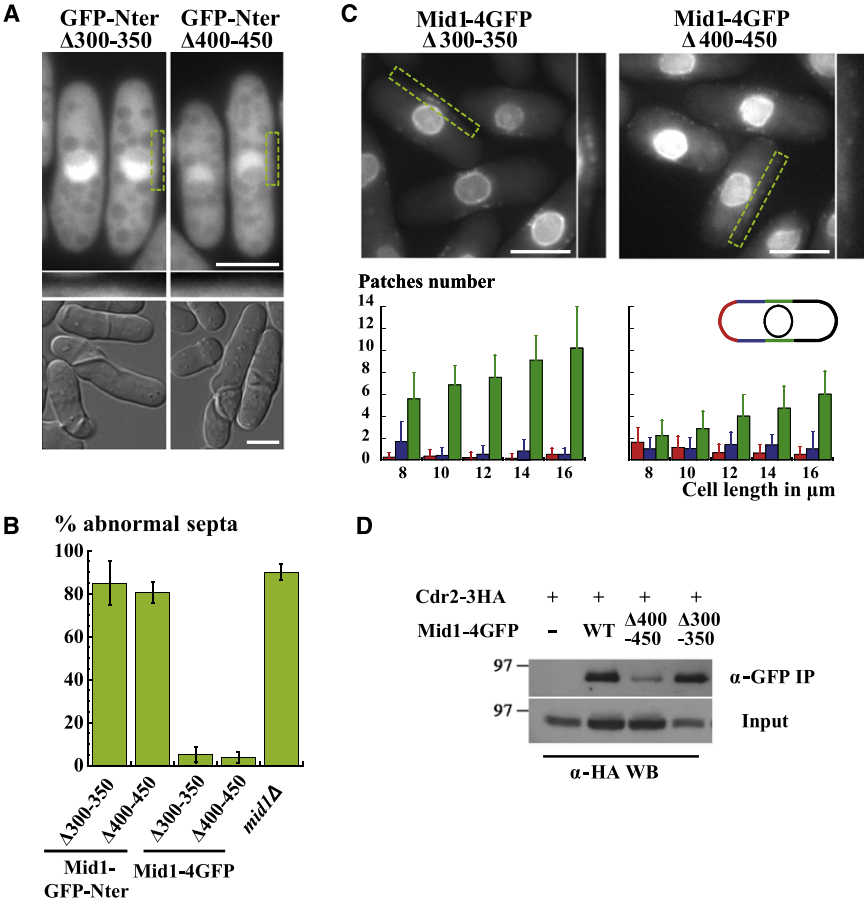


Figure 2. Identification of a Cortex-Targeting Domain Controlling Mid1 Interaction with Cdr2

(A) Top: localization of Mid1 GFP-Nter Δ300–350 and GFP-Nter Δ400–450 constructs in *mid1*Δ cells. GFP-Nter Δ300–350 and Δ400–450 are absent from the medial cortex in interphase. Insets underneath correspond to magnified (2×) and contrast-enhanced views of green boxed regions. Bottom: DIC images of similar cells. Scale bars represent 5 μm.

(B) Percentage of displaced septa in *mid1*Δ cells expressing Mid1 GFP-Nter Δ300–350 and GFP-Nter Δ400–450 or full-length Mid1-4GFP carrying same deletions. Cells were grown at 30°C. Means ± SD (error bars) were calculated on six to nine independent counts on 100 cells each.

(C) Top: localization of Mid1-4GFP Δ300–350 and Mid1-4GFP Δ400–450 in *mid1*Δ cells during interphase. Insets on the right correspond to magnified (2×) and contrast-enhanced views of green boxed regions. Scale bars represent 5 μm. Bottom: mean number of cortical patches at tip (red), lateral (blue) and medial cortex (green) in *mid1*Δ cells expressing Mid1-4GFP Δ300–350 and Mid1-4GFP Δ400–450 cells as shown on the scheme on the right side. Counts were made on the medial focal plane. Means ± SD (error bars) were calculated on 200 cells from two independent experiments.

(D) Coimmunoprecipitation assay between Cdr2-3HA and the indicated Mid1-4GFP constructs (WT; Δ400–450 or Δ300–350). Immunoprecipitation was performed with an anti-GFP mAb. Cdr2-3HA was detected on immunoblots with anti-HA mAb (α-HA WB) in extracts before immunoprecipitation (Input) and in immunoprecipitation samples (α-GFP IP). In the first lane, extracts from cells expressing untagged Mid1 and Cdr2-3HA were used as a negative control.

formed a single contractile ring, similar to that described for wild-type cells [8, 9], at the cell middle. However, in the Mid1^{nsm} *cdr2*Δ double mutant, myosin II appeared across a broad region of the cortex, leading to a high frequency of double and/or misplaced contractile rings. Double rings were only observed at low frequency in single *cdr2*Δ cells. We made similar observations when we combined *cdr2* deletion with Mid1 mutants defective in only one of the nuclear-localization motifs (Figure S5A and S5B). In a control experiment, we observed no defects when we combined Mid1^{nsm} with deletion of the mitotic kinase Cdr1 [16–18] (Figure S5C), indicating that our results do not stem from increased cell length or mitotic delay.

We conclude that fission yeast cytokinesis uses two overlapping mechanisms to position Mid1 at the central cortex. First, Cdr2 anchors Mid1 at the medial cortex during interphase through a physical interaction. Because Mid1^{nsm} is present at the tips of *cdr2*Δ cells, we propose that the Mid1-Cdr2 interaction controls the previously described negative regulation of Mid1 cortical distribution at cell tips [3, 4]. Second, nuclear export triggered by Plo1 kinase at the G2/M transition targets Mid1 to the cortex proximal to the nucleus. In the absence of both mechanisms, Mid1 cannot position the division plane properly.

We further tested the role of Mid1 nuclear export by displacing the nucleus from the cell center in both wild-type cells and the Mid1^{nsm} mutant. In this experiment, we treated cells with the microtubule-depolymerizing drug MBC and centrifuged them to displace the nucleus. Previous work has shown that the division plane is repositioned near the displaced nucleus [1, 2]. We observed this phenomenon in time-lapse movies of wild-type cells expressing a nuclear-envelope marker (Nup107-GFP) and a contractile-ring marker (Rlc1-mCherry). Because we maintained cells in the presence of MBC, displaced nuclei did not divide but were cut by contraction of the contractile ring, which generated two daughter cells of unequal size (Figures 4A and 4B). In contrast, Mid1^{nsm} mutant cells with displaced nuclei assembled the contractile ring in the cell center independently of nuclear position (Figures 4A and 4B). Contraction of this central contractile ring produced two similarly sized daughter cells, one of which inherited the undivided nucleus. We made similar observations when we centrifuged Mid1 mutants defective in only one of the nuclear-localization motifs (Figure S6A). This result demonstrates that repositioning of the division plane upon nuclear displacement requires Mid1 nuclear export. In addition, the Mid1 C-terminal amphipathic helix was required for division-plane repositioning, indicating a role for Mid1 membrane binding upon nuclear displacement (Figure S7).

Finally, we observed Mid1 and Cdr2 after nuclear displacement (Figure S6B). In wild-type cells, Mid1 became visible in the vicinity of the displaced nucleus and formed the contractile ring at this location. In contrast, Cdr2 stayed at the cell center until mitosis, when it localized to the cytoplasm [14]. This indicates that nuclear position does not direct Cdr2 localization, at least not at this stage of the cell cycle, and that Mid1 nuclear export functions independently of Cdr2 to reposition the division plane upon nuclear displacement. Importantly, in contrast

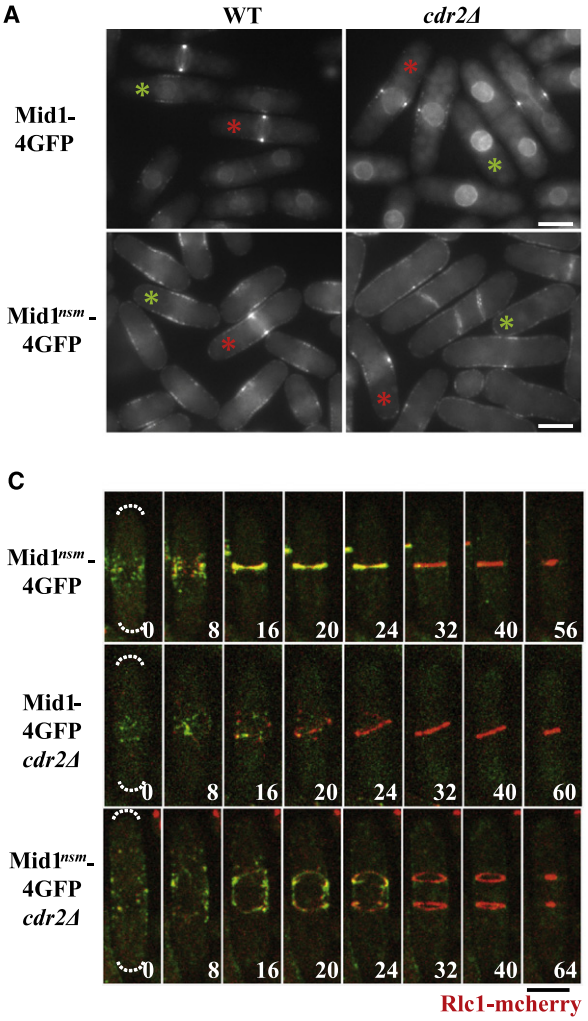


Figure 3. Cdr2 Deletion Induces Ring-Assembly Defects when Mid1 Nuclear Shuttling Is Abolished

(A) Localization of Mid1-4GFP and Mid1^{nsm}-4GFP in wild-type and *cdr2*Δ cells deleted for endogenous *mid1*. Mitotic and interphase cells are indicated by red and green asterisks, respectively. Note the even distribution of Mid1^{nsm} around the cortex in the absence of Cdr2 during interphase. Scale bars represent 5 μm.

(B) Percentage of abnormal septa in Mid1^{nsm}-4GFP, Mid1-4GFP *cdr2*Δ, and Mid1^{nsm}-4GFP *cdr2*Δ strains. Cells were grown at 30°C. Means ± SD (error bars) were calculated from six independent counts of 100 cells each.

(C) Time-lapse movies of Mid1^{nsm}-4GFP, Mid1-4GFP *cdr2*Δ, and Mid1^{nsm}-4GFP *cdr2*Δ cells expressing Rlc1-mcherry as a marker for the contractile ring. Mid1 is shown in green and Rlc1 in red. Time is in minutes. The scale bar represents 5 μm.

(D) Quantification of misplaced and double rings in the same strains as in (C). Data from two independent experiments were pooled. n = 128, 137, and 199 for Mid1^{nsm}-4GFP, Mid1-4GFP *cdr2*Δ, and Mid1^{nsm}-4GFP *cdr2*Δ strains, respectively.

to wild-type Mid1, Mid1^{nsm} maintained a central cortical localization upon nuclear displacement (Figure S6B). This indicates that when Mid1 nuclear export is disrupted or when Mid1 cannot bind to the cortex independently of Cdr2, Mid1 distribution is controlled by Cdr2 through their physical interaction, which promotes division-plane positioning in the cell middle.

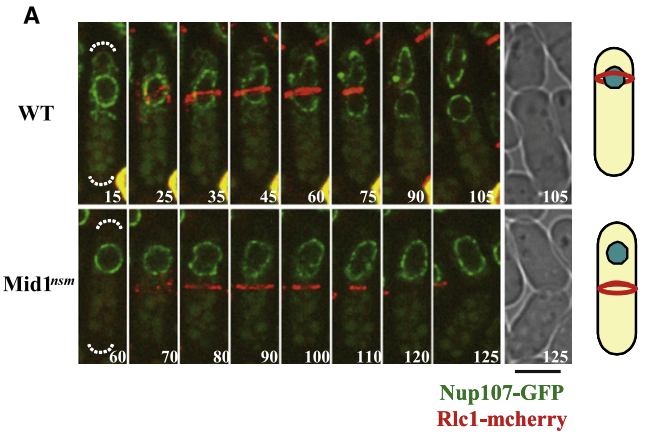
We have identified two molecular mechanisms that position the division plane at the cell center by controlling the localization and function of Mid1 (Figure 4C). Both mechanisms are sufficient for Mid1 function, but cells fail to properly position the division plane when both mechanisms are disrupted.

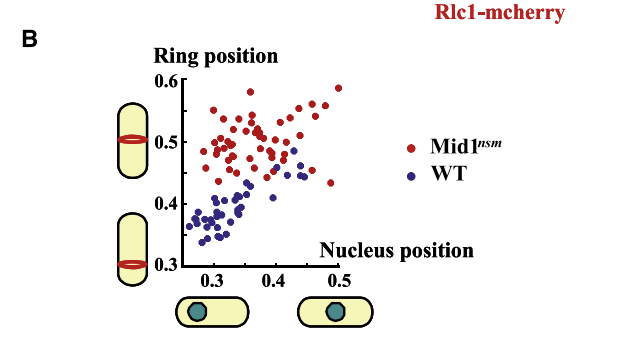
During interphase, the kinase Cdr2 positions Mid1 at the central cortex through interaction with its N-terminal domain, as shown by localization requirements, physical interaction, and functional assays. Cdr2 restricts Mid1 distribution to the medial cortex specifically during interphase, indicating that Cdr2 underlies the negative regulation of Mid1 distribution at cell tips [3, 4, 19]. Consistent with this, Cdr2 is negatively regulated at cell tips by the polarity kinase Pom1 and cell growth [20, 21]. Thus, Cdr2 relays positional information to establish the position of the division plane according to the pattern of polarized growth.

Second, nuclear export targets Mid1 to the cortex proximal to the nucleus. This mechanism may operate at the G2/M transition when the Plo1 kinase triggers complete export of nuclear Mid1. During mitosis, Cdr2 leaves the central cortex and becomes cytoplasmic. Mid1 then associates with the central cortex through its C-terminal amphipathic helix, independently of Cdr2. Our results show that Mid nuclear export underlies the ability of the fission yeast nucleus to position the division plane, in contrast to previous models that suggested a role for physical tethering of Mid1 and the nucleus [1]. Interestingly, these findings indicate that nuclear export can generate positional information in cells and have potential implications for a broad range of eukaryotic cell functions.

In the absence of Mid1, contractile-ring assembly requires signaling from the SIN (septation initiation network [22]), a regulatory network that also promotes contractile-ring contraction and septum synthesis upon mitotic exit (see [23]). Activity of the SIN is required for the dephosphorylation and robust recruitment to the contractile ring of the F-BAR domain protein Cdc15 [22]. In this context, polarity factors including Pom1 direct additional mechanisms that prevent contractile-ring assembly at cell tips [24]. These mechanisms probably operate when both Cdr2-dependent and Mid1-nuclear-export-dependent positioning mechanisms are deficient. Accordingly, despite Mid1^{nsm} localization throughout the cortex, including at cell tips, we did not observe contractile rings or septa at the tips in the *cdr2*Δ Mid1^{nsm} mutant.

Cdr2 also organizes a signaling network regulating mitotic entry through Wee1 [12, 13, 20, 21], suggesting potential links between cell cycle progression and cytokinesis regulatory systems. During mitosis, when Cdr2 is cytoplasmic, Mid1 binds to the mitotic kinase Plo1 [15] and the phosphatase Clp1 [25], two other important regulators of mitosis and cytokinesis. Of note, the minimum interaction site for Clp1 on Mid1 (amino acids 431–481) overlaps with the site required for Mid1 interaction with Cdr2 (amino acids 400–450). It will be interesting to determine whether Cdr2 and Clp1 compete





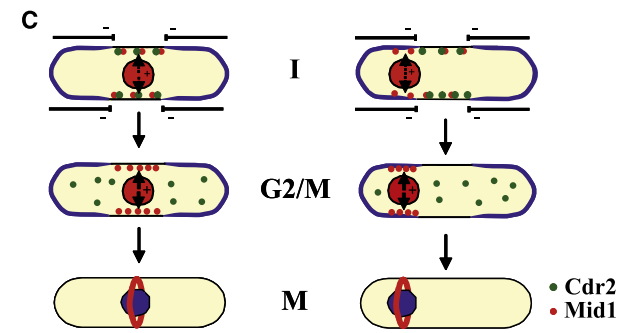


Figure 4. Mid1 Nuclear Shuttling Is Essential for Repositioning the Division Plane upon Nuclear Displacement

(A) Time-lapse movie of wild-type and Mid1^{nsm} cells after nucleus centrifugation. These cells also express Nup107-GFP to allow visualization of displaced nuclei and Rlc1-mCherry to allow visualization of contractile rings. MBC is present throughout the experiment and blocks nuclear division. Transmitted light images of the last time points are shown on the right to allow visualization of the size of daughter cells. Indicated time points correspond to time in minutes after nuclear displacement. The scale bar represents 5 μm.

(B) Coupling between the positions of the ring and nucleus in wild-type (blue) or Mid1^{nsm} cells (red). Ring position is plotted against nucleus position in the same cell. Nucleus and ring positions are defined by the distance from the cell tip closer to the nucleus; this distance is expressed as the fraction of overall cell length. n = 41 and 51, respectively.

(C) Model for Division-Plane Positioning in Normal Conditions and after Nucleus Centrifugation.

During interphase, Cdr2 (in green) anchors Mid1 (in red) to medial nodes. The negative regulation by cell tips (blue zones) maintains these nodes in the medial region. In a parallel pathway, local exit of Mid1 from the nucleus is activated by Plo1 at the G2/M transition and positions Mid1 at the medial cortex. These overlapping mechanisms ensure proper specification of the division plane. Upon displacement of the nucleus, a new cortical band of Mid1 exported from the nucleus assembles in the region of the displaced nucleus to position the contractile ring, whereas Cdr2 remains located at the medial cortex until mitosis.

for binding on Mid1 at mitotic transitions; such competition would have implications for the temporal regulation of cytokinetic events.

In conclusion, we have shown that Mid1 delivery to the central cortex depends on two overlapping mechanisms that ensure specification of the division plane in the middle of the cell. These two mechanisms relay distinct positional information on cell polarity and nuclear localization and lead to equal partitioning of the cytoplasm and correct segregation of chromosomes. When the two mechanisms are spatially separated by nuclear displacement, Mid1 nuclear export, which operates later during the cell cycle, is dominant over Cdr2-dependent positioning of Mid1. Overlapping regulatory systems appear to underlie spatial regulation of cytokinesis in a range of cell types [26, 27]. For example, the *Caenorhabditis elegans* cell division plane is positioned by consecutive spatial signals from astral microtubules and the spindle midzone [28, 29]. One target of these signals is anillin [30–33], which serves as a scaffold to build the contractile ring (see [34]) and is functionally related to Mid1. Such overlapping systems provide robust spatial control of cytokinesis to maintain genomic stability.

Supplemental Data

Supplemental Data include Supplemental Experimental Procedures, seven figures, and one table and can be found with this article online at http://www.cell.com/current-biology/supplemental/S0960-9822(09)00985-3.

Acknowledgments

We thank Phong Tran, Matthieu Piel, and Renata Basto for discussion and critical reading of the manuscript and Kathy Gould and Valérie Doye for strains. This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche (BLAN06-3_135468), Association pour la Recherche sur le Cancer (n°4934), and Fondation pour la Recherche Médicale (INE20071110973) to A.P.; M.A. received a doctoral fellowship from the Ministère de la recherche (France); J.B.M. was supported by a postdoctoral fellowship from the American Cancer Society (PF-07-129-01-MBC); and P.N. received support from the Breast Cancer Research Foundation and The Rockefeller University.

Received: January 18, 2009
Revised: March 23, 2009
Accepted: April 9, 2009
Published online: May 7, 2009

References

1. Daga, R.R., and Chang, F. (2005). Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *102*, 8228–8232.
2. Tolic-Norrelykke, I.M., Sacconi, L., Stringari, C., Raabe, I., and Pavone, F.S. (2005). Nuclear and division-plane positioning revealed by optical micromanipulation. Curr. Biol. *15*, 1212–1216.
3. Celton-Morizur, S., Racine, V., Sibarita, J.B., and Paoletti, A. (2006). Pom1 kinase links division plane position to cell polarity by regulating Mid1p cortical distribution. J. Cell Sci. *119*, 4710–4718.
4. Padte, N.N., Martin, S.G., Howard, M., and Chang, F. (2006). The cell-end factor pom1p inhibits mid1p in specification of the cell division plane in fission yeast. Curr. Biol. *16*, 2480–2487.
5. Sohrmann, M., Fankhauser, C., Brodbeck, C., and Simanis, V. (1996). The dmf1/mid1 gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. Genes Dev. *10*, 2707–2719.
6. Chang, F., Woollard, A., and Nurse, P. (1996). Identification and characterization of fission yeast mutants defective in actin ring assembly and placement. J. Cell Sci. *109*, 131–142.
7. Paoletti, A., and Chang, F. (2000). Analysis of mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. Mol. Biol. Cell *11*, 2757–2773.
8. Wu, J.Q., Kuhn, J.R., Kovar, D.R., and Pollard, T.D. (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. Dev. Cell *5*, 723–734.

9. Motegi, F., Mishra, M., Balasubramanian, M.K., and Mabuchi, I. (2004). Myosin-II reorganization during mitosis is controlled temporally by its dephosphorylation and spatially by Mid1 in fission yeast. J. Cell Biol. *165*, 685–695.
10. Wu, J.-Q., Sirotkin, V., Kovar, D.R., Lord, M., Beltzner, C.C., and Kuhn, J.R. (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. J. Cell Biol. *174*, 391–402.
11. Celton-Morizur, S., Bordes, N., Fraisier, V., Tran, P.T., and Paoletti, A. (2004). C-terminal anchoring of mid1p to membranes stabilizes cytokinetic ring position in early mitosis in fission yeast. Mol. Cell. Biol. *24*, 10621–10635.
12. Breeding, C.S., Hudson, J., Balasubramanian, M.K., Hemmingsen, S.M., Young, P.G., and Gould, K.L. (1998). The cdr2(+) gene encodes a regulator of G2/M progression and cytokinesis in Schizosaccharomyces pombe. Mol. Biol. Cell *9*, 3399–3415.
13. Kanoh, J., and Russell, P. (1998). The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast. Mol. Biol. Cell *9*, 3321–3334.
14. Morrell, J.L., Nichols, C.B., and Gould, K.L. (2004). The GIN4 family kinase, Cdr2p, acts independently of septins in fission yeast. J. Cell Sci. *117*, 5293–5302.
15. Bahler, J., Steever, A.B., Wheatley, S., Wang, Y., Pringle, J.R., Gould, K.L., and McCollum, D. (1998). Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. J. Cell Biol. *143*, 1603–1616.
16. Coleman, T.R., Tang, Z., and Dunphy, W.G. (1993). Negative regulation of the wee1 protein kinase by direct action of the nim1/cdr1 mitotic inducer. Cell *72*, 919–929.
17. Parker, L.L., Walter, S.A., Young, P.G., and Piwnica-Worms, H. (1993). Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase. Nature *363*, 736–738.
18. Wu, L., and Russell, P. (1993). Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. Nature *363*, 738–741.
19. Bahler, J., and Pringle, J.R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. Genes Dev. *12*, 1356–1370.
20. Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A., and Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. Nature, in press.
21. Martin, S.G., and Berthelot-Grosjean, M. (2009). Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1p couple cell length with the cell cycle. Nature, in press.
22. Hachet, O., and Simanis, V. (2008). Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. Genes Dev. *22*, 3205–3216.
23. Krapp, A., and Simanis, V. (2008). An overview of the fission yeast septation initiation network (SIN). Biochem. Soc. Trans. *36*, 411–415.
24. Huang, Y., Chew, T.G., Ge, W., and Balasubramanian, M.K. (2007). Polarity determinants Tea1p, Tea4p, and Pom1p inhibit division-septum assembly at cell ends in fission yeast. Dev. Cell *12*, 987–996.
25. Clifford, D.M., Wolfe, B.A., Roberts-Galbraith, R.H., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, and Gould, K.L. (2008). The Clp1/Cdc14 phosphatase contributes to the robustness of cytokinesis by association with anillin-related Mid1. J. Cell Biol. *181*, 79–88.
26. Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. Science *307*, 1735–1739.
27. Werner, M., and Glotzer, M. (2008). Control of cortical contractility during cytokinesis. Biochem. Soc. Trans. *36*, 371–377.
28. Dechant, R., and Glotzer, M. (2003). Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation. Dev. Cell *4*, 333–344.
29. Bringmann, H., and Hyman, A.A. (2005). A cytokinesis furrow is positioned by two consecutive signals. Nature *436*, 731–734.
30. D'Avino, P.P., Takeda, T., Capalbo, L., Zhang, W., Lilley, K.S., Laue, E.D., and Glover, D.M. (2008). Interaction between Anillin and RacGAP50C connects the actomyosin contractile ring with spindle microtubules at the cell division site. J. Cell Sci. *121*, 1151–1158.
31. Gregory, S.L., Ebrahimi, S., Milverton, J., Jones, W.M., Bejsovec, A., and Saint, R. (2008). Cell division requires a direct link between microtubule-bound RacGAP and Anillin in the contractile ring. Curr. Biol. *18*, 25–29.
32. Hickson, G.R., and O'Farrell, P.H. (2008). Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis. J. Cell Biol. *180*, 285–294.
33. Piekny, A.J., and Glotzer, M. (2008). Anillin is a scaffold protein that links RhoA, actin, and myosin during cytokinesis. Curr. Biol. *18*, 30–36.
34. Hickson, G.R., and O'Farrell, P.H. (2008). Anillin: A pivotal organizer of the cytokinetic machinery. Biochem. Soc. Trans. *36*, 439–441.

Chemical Science

View Online / Journal Homepage
Dynamic Article Links

Cite this: DOI: 10.1039/c2sc20652h

www.rsc.org/chemicalscience

EDGE ARTICLE

Reactive protein-repellent surfaces for the straightforward attachment of small molecules up to whole cells†

Stijn F. M. van Dongen,*[ab] Julie Janvore,[b] Sander S. van Berkel,[c] Emmanuelle Marie,[a] Matthieu Piel[b] and Christophe Tribet*[a]

Received 23rd May 2012, Accepted 4th July 2012
DOI: 10.1039/c2sc20652h

Published on 05 July 2012 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C2SC20652H
Downloaded by Radboud Universiteit Nijmegen on 19 July 2012

Here we present a readily accessible strategy for creating protein-resistant surfaces that contain azides, based on the spontaneous adsorption of a comb-like copolymer. Using a strain-promoted azide alkyne cycloaddition, we illustrate the single-step conjugation of various representatives of important applications, being the labelling with small organic molecules, capture of nanoparticles, attachment of native enzymes at a controlled density, and finally control of cell adhesion. We thus demonstrate that advanced biomaterials can be created in two straightforward steps without requiring additional reagents, which should make this strategy a valuable tool for researchers in diverse fields.

Introduction

The successful and widespread adoption of surface coatings strongly depends on parameters such as the quality of the coating, the ease of preparation and the reproducibility of its application protocol. This may be one of the reasons why poly-(L-lysine)-*graft*-poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG) has found broad recognition as a surface passivation agent in numerous biological experiments and in several biomedical devices.[1–3] PLL-g-PEG is a polycationic comb-like PEG-grafted copolymer (**1**, see Fig. 1) that has been shown to spontaneously chemisorb from aqueous solution onto anionic surfaces, such as metal oxides, metal oxide ceramics, glass, or tissue culture polystyrene.[4,5] The resulting layer of grafted PEG imparts a high resistance to protein adsorption, which has made PLL-g-PEG coating a popular material for a variety of applications ranging from microreactor coating[1] to single cell patterning[3] to cell surface engineering.[6] In these examples, the near absence of non-specific protein adsorption has allowed for the efficient handling of complex biological samples, such as serum, whole blood or living cells.

Unfortunately, PLL-g-PEG coatings generally do not offer the possibility for further modification. *Vice versa*, the ease of application and high protein resistance of PLL-g-PEG coatings are attractive properties for any type of coating that imparts reactivity to a surface. Several strategies for the fabrication of surfaces bearing biocompatible reactive groups such as azides,[7–9] alkynes,[8–10] acyl ketene precursors,[8] functionalities that participate in Diels–Alder reactions,[9,11] or nitrile oxides[12] have been reported. These strategies succeed in insulating the surface conjugation process from the environment, but do not produce bio-inert surfaces. For the above-cited applications, it is highly desirable to combine the ease and universal protection of PLL-g-PEG with the possibility of rapid surface modification. Additionally, a dynamic approach that allows post-modification, or even *in situ* surface-conjugation in the presence of cells, would expand the utility of any functional coating to encompass advanced applications in chemical biology. We here present such a facile benchtop protocol for the fabrication of dynamically reactive, yet highly protein repellent surfaces based on azido-(PLL-g-PEG) (APP, **2**, see Fig. 1), a material that unites cell-repellent properties with excellent reactivity.

Amongst the most frequently used biocompatible reactive groups, azides are considered the most stable and versatile ones,[13,14] and their incorporation in biomacromolecules by chemical[15–18] or biological[19–23] means is pursued by many research groups. Azides can undergo a series of chemoselective reactions such as the Curtius rearrangement, Staudinger ligations, and Huisgen 1,3-dipolar cycloadditions. Azide-based cycloaddition reactions have recently received significant attention through the Cu-catalysed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and the strain-promoted azide–alkyne cycloaddition (SPAAC). The latter employs a strained cyclooctyne to react with an azide in a spontaneous, catalyst-free cycloaddition.[24] As a result of these mild reaction conditions, this reaction is highly biocompatible and thus particularly suitable for our purpose. From the different cyclooctynes available we selected bicyclo [6.1.0]nonyne (BCN)‡[25] for its high reactivity and low

[a]*École Normale Supérieure, Dept. of Chemistry, UMR 8640 CNRS-ENS-UPMC, 24 rue L'homond, 75005, Paris, France. E-mail: ENS@StijnvanDongen.nl; Christophe.Tribet@ens.fr*
[b]*Institut Curie, Team Systems Biology of Cell Division and Cell Polarity, UMR 144 IC-CNRS, 26 rue d'Ulm, 75248 Cedex 05, Paris, France*
[c]*SynAffix B.V., Heyendaalsweg 135, 6525 AJ, Nijmegen, Netherlands*
† Electronic supplementary information (ESI) available: Complete experimental procedures and additional experimental data are given. Source movies for Fig. 6 showing cell adhesion and spreading on modified surfaces are available. See DOI: 10.1039/c2sc20652h

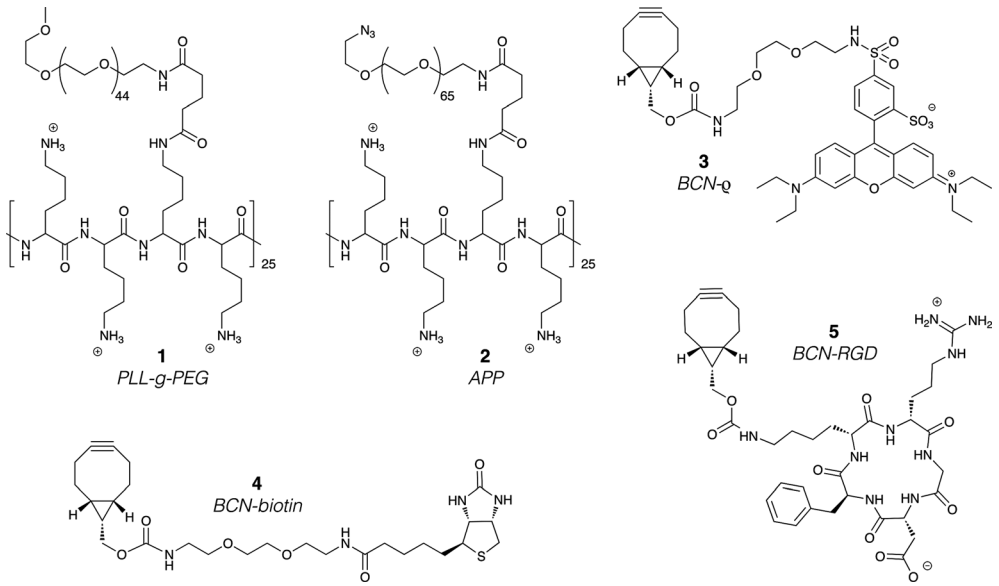


Fig. 1 Structures and abbreviated names of compounds used in this report.

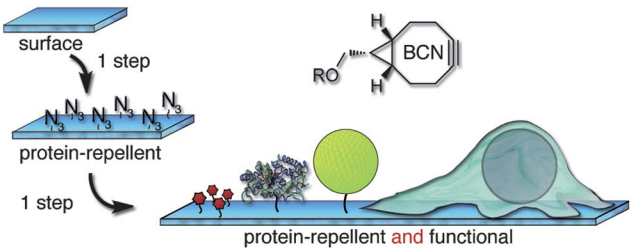


Fig. 2 Schematic representation of the strategy used in this report. Each arrow represents a straightforward aqueous washing and rinsing step that can be performed at a bench, while the resulting substrates are highly protein-repellent and can readily be functionalised further.

Published on 05 July 2012 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C2SC20652H
Downloaded by Radboud Universiteit Nijmegen on 19 July 2012

lipophilicity.[26] A graphical representation of our strategy is presented in Fig. 2.

As a proof of concept we first sought to demonstrate that using azide-terminated PEG in APP combines the advantages of PLL-g-PEG and an azide-coated surface. Owing to an azide's small size, inertness and polarity it is not unreasonable to assume that azide-terminated PEG-chains may behave in a similar manner as conventional methoxy-PEG. Also, groups in the periphery of bottle brush polymers are known to be sterically available for reactions.[27] Whereas azide-grafted PLL materials have been shown to be compatible with SPAAC immobilisation as proven by fluorescent labelling,[28] no protein-repellent properties or straightforward coating of common substrates have been reported for these materials. For both the application of the surface coating and the subsequent post-functionalisation, the major advantages of our strategy are the absence of additional reagents and catalysts, and that no special conditions are required to obtain surfaces that are both functional and protein-repellent. Moreover, all steps involve aqueous solutions that can be used at physiological pH and salt concentrations and at ambient temperatures, which makes this procedure ideal and easy to adopt for applications in different research areas.

Experimental section

Synthesis and characterisation of APP

APP (**2**) was synthesised by using PLL·HBr with an average molecular weight of 20 kDa and *N*-hydroxysuccinimide-activated azido-PEG with an average molecular weight of 3 kDa. The resulting APP had a grafting density of one PEG-chain per three lysine residues. Ellipsometry measurements indicated that application of APP to a quartz wafer resulted in a PEG-layer that contained 0.265 chains per nm^2, suggesting an equivalent azide density (see ESI† for detailed procedures and analysis).

General strategy for surface coating with APP

Clean surfaces (either glass, quartz, PDMS or cell culture treated polystyrene) were exposed to O_2 plasma for 45 seconds. The surfaces were then laid on top of a 200 μL drop of 0.1 mg mL^{-1} APP (**2**) in 10 mM HEPES, pH 7.4 (200 μL) at room temperature for 1 hour (this volume has to be adapted to the surface size to allow complete coverage of the surface by the solution, but use a minimal amount). The substrates were rinsed once with PBS, twice with MilliQ and then dried. Detailed protocols are available in the ESI.†

General strategy for surface conjugation

BCN-derived compounds were used as stock solutions (100 μM in PBS pH 7.5) which were stored in small aliquots at −20 °C. APP-coated surfaces were covered with these solutions and left to react at room temperature for 1 hour. Afterwards, the surfaces were washed with PBS, and rinsed with MilliQ at least three times. The surfaces were either used immediately after preparation, or dried under an air stream and stored at 4 °C. Detailed protocols are available in the ESI.†

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

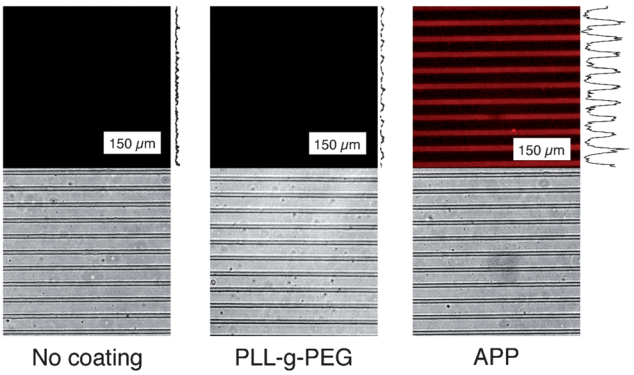


Fig. 3 Fluorescence and transmission micrographs of PDMS microchannels coated with either PLL-g-PEG or APP where indicated, and reacted with BCN-ρ. Traces represent fluorescence intensity.

Results and discussion

PDMS microchannel functionalisation

To investigate the availability of the azides in APP for SPAAC-conjugation, we applied an APP coating or a conventional PLL-g-PEG coating to separate PDMS-based microreactors. Subsequently, a solution containing BCN-linked rhodamine (**3**, BCN-ρ, 100 μM stock solution in MilliQ) was incubated in the microchannels during one hour, followed by extensive washing. For the APP-coated microreactor, this resulted in clearly visible microchannels, whereas the PLL-g-PEG-coated or uncoated microreactors retained negligible fluorescence, at levels attributable to physisorption of **3** (Fig. 3).

Microparticle capture assays

Having validated the intended functionality of APP, we investigated a more intricate system using BCN–biotin (**4**). Biotin, a widely used biological recognition element, forms a strong binding complex with a range of proteins such as avidin, streptavidin or neutravidin. This property is utilised in many biological assays, and as such, PEGylated surfaces that cleanly display biotin are of great interest.[29] We coated cell culture petri dishes (glass and polystyrene) with APP or PLL-g-PEG. These dishes were then incubated with a 100 μM stock solution of **4** in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.5) buffer for one hour, after which they were washed three times with PBS and three times with MilliQ. The presence of biotin was revealed by subsequent incubation (30 min) with a 0.01 wt% suspension of neutravidin-coated polystyrene microspheres in PBS which were yellow-green fluorescently labeled (FluoSpheres F-8776 from Invitrogen). As shown in Fig. 4a, APP-coated glass captured a large amount of FluoSpheres, whereas PLL-g-PEG coated surfaces did not. Perhaps just as importantly, the same background level of fluorescent beads was found on APP-coated surfaces that had not been treated with BCN–biotin, thus demonstrating that the stealth properties of APP are virtually identical to those of PLL-g-PEG.

We conducted further investigations using BCN–biotin and FluoSpheres to assess the durability of APP coatings, and the persistence of its reactivity. For this, APP-coated fluorodishes were covered with a lid and sealed with parafilm immediately

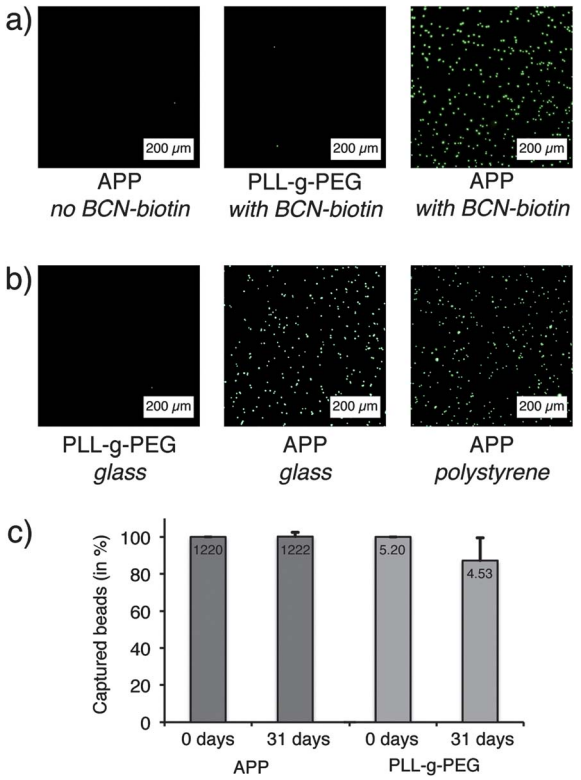


Fig. 4 (a) Glass surfaces coated with either PLL-g-PEG or APP and reacted with BCN–biotin where indicated. The slides were incubated with neutravidin-coated FluoSpheres for 30 min and washed. (b) Glass or polystyrene surfaces coated with either PLL-g-PEG or APP as indicated, and stored for 31 days. The slides were then treated with BCN–biotin and incubated with FluoSpheres as described above. (c) Comparison between the average amount of FluoSpheres captured per mm^2 for freshly prepared glass substrates or for substrates which were coated a month prior to use. Bars are relative to "0 days," numbers give actual values.

after their preparation and stored at 4 °C for at least 31 days. These month-old dishes were subsequently treated with BCN–biotin and used in FluoSphere capture assays as described above. Fluorescent imaging experiments showed that the prolonged storage of the APP coatings did not negatively influence either their reactivity or their repellent properties in a significant way. Dishes that were coated with APP a month prior to the assay still showed high binding of the FluoSpheres to the surface, indicating that these azide-containing coatings have an excellent durability (see Fig. 4b). Fig. 4c shows a comparison between the amount of FluoSpheres immobilised on freshly prepared substrates and the amount captured by aged ones. There is no appreciable difference for aged substrates, which illustrates our previous findings.

Subsequently, we studied the control of the degree of functionalisation upon varying the azide content of APP. Variation of the surface density of a particular recognition signal is highly desirable in order to allow for tuneable quantities of antigen, peptide or fluorophore to be addressed to the surface of interest.[28] To influence the surface density of available reactive sites, we constructed APP having only one out of three PEG chains carrying a terminal azide moiety, with the remainder of the grafts being conventional inert methoxy-PEG. For this, PLL

Published on 05 July 2012 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C2SC20652H
Downloaded by Radboud Universiteit Nijmegen on 19 July 2012

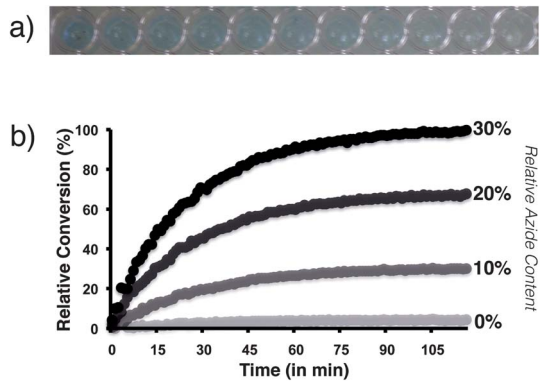


Fig. 5 (a) polystyrene wells coated with a mixture of APP and PLL-g-PEG, with an APP content varying from 100% (left) to 0% (right) with 10% steps. The APP is functionalised with BCN–biotin, on which streptavidin–HRP is immobilised. The oxidation of TMB by HRP yielded a blue product (image taken after 2 hours of conversion). (b) Representative progress curves of the oxidation of TMB by HRP for coatings having different APP contents.

was first grafted with 30% azido-PEG (100% denotes the amount of PEG necessary to obtain a grafting ratio of 1 PEG chain per 3 lysine residues) and analysed by ^{1}H-NMR. Next, the remaining 70% methoxy-PEG was grafted and the final APP was again analysed by ^{1}H-NMR. Comparison of the signals for grafted lysine side chains provided a measure of azide-density in the APP, which was found to be 28% (see ESI†). Partially functional APP indeed binds only a proportional amount of FluoSpheres (see ESI, Fig. S4†), demonstrating excellent synthetic control over the surface reactivity.

Enzyme-linked assay

An alternative approach to control the surface reactivity is to dilute the reactive APP with standard PLL-g-PEG. This has the advantage that no additional synthesis is required, and that any desired ratio of azido- and methoxy-PLL-g-PEG can be used. To verify the efficacy of this strategy, we expanded on the use of BCN–biotin (**4**) with APP by applying it in an enzyme-linked assay. These types of assays are a powerful tool in many

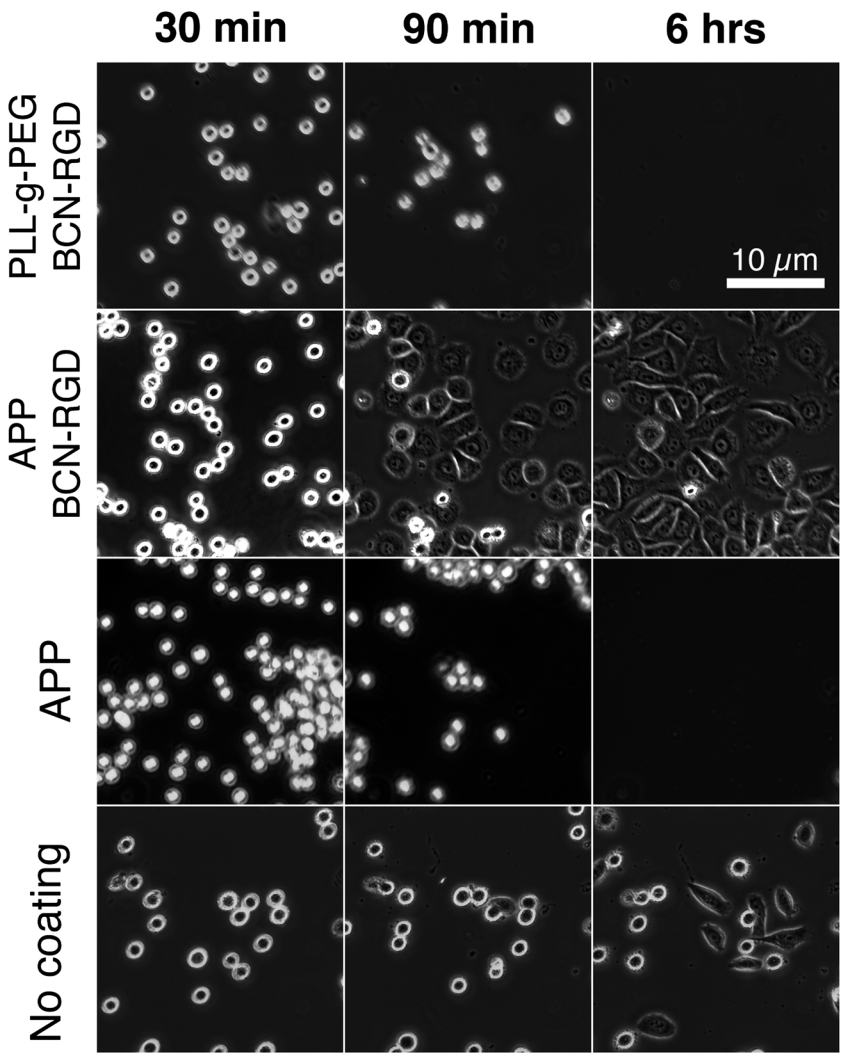


Fig. 6 Phase contrast micrographs of HeLa cells at different time intervals after seeding on APP or PLL-g-PEG coated glass slides, incubated with BCN–RGD as indicated. See ESI† for video microscopy movies.

Published on 05 July 2012 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C2SC20652H
Downloaded by Radboud Universiteit Nijmegen on 19 July 2012

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

Published on 05 July 2012 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C2SC20652H
Downloaded by Radboud Universiteit Nijmegen on 19 July 2012

biochemical strategies (*e.g.* ELISA), and are routinely performed in many labs. We applied a straightforward model assay using streptavidin–horseradish peroxidase (streptavidin–HRP; OptEIA kit, from BD Biosciences), which is based on the chromogenic oxidation of tetramethylbenzidine (TMB) in the presence of hydrogen peroxide. To perform this assay, we made dilutions of APP in PLL-g-PEG with APP percentages ranging from 0% to 100% (10%-steps). These mixtures were subsequently used to coat different wells of a standard flat-bottomed 96-well plate, whereupon the wells were incubated with a BCN–biotin solution (100 μM in PBS). After 1 hour of incubation, the wells were washed with PBS (3×) and with MilliQ (3×), followed by the addition of streptavidin–HRP to each well according to a standard protocol (see ESI†). After half an hour incubation, the wells were again washed with PBS and MilliQ. HRP activity was then detected using the TMB and H_2O_2 stock solutions (50 μL each). Fig. 5a shows the wells coated with different concentrations APP and subsequently treated as described above after 2 hours of conversion. The linear dilution of APP that was coated in the wells relates well to the decreasing HRP activities. In Fig. 5b, corresponding progress curves of the enzymatic activity are shown, emphasising the control that mixing APP with PLL-g-PEG gives over the surface density of azides, and in turn of the density of grafted enzymes. Since the coated wells were inherently PEGylated as a result of the application of PLL-g-PEG or APP, there was no need to take measures against aspecific protein binding using serum albumins or detergents, as shown by the nearly zero activity displayed on 0% APP coatings.

Cell attachment and proliferation

Finally, an increased level of complexity is obtained when the interaction of APP with cells could be specifically directed. Sufficiently PEGylated surfaces have strong cell repelling properties, as a result of the limited protein interaction with the surface, hindering cell adhesion.[2] Using APP, we combined this repellency with the capability to present specific recognition oligo-peptides. The amino acid sequence RGD (Arg-Gly-Asp) is present in many extracellular matrix proteins such as fibronectin and laminin, and is important for cellular growth, differentiation, and proliferation.[30] Immobilisation of RGD-containing peptides on various surfaces has been reported to mediate specific surface cell interactions and to promote cell organisation,[31] even against non-fouling backgrounds.[32–34] Extensive studies by Kessler and co-workers have revealed that the cyclic pentapeptide c[RGDfK] specifically interacts with $\alpha_v\beta_3$ integrins to promote cell adhesion,[35] and that the amine in the lysine residue can be functionalised without negatively influencing the peptide's biological function. Consequently, we synthesised BCN–RGD **5** (see Fig. 1), aiming to switch on cell adhesion through specific receptor interaction on otherwise cell repellent surfaces, by covalently linking the BCN–RDG integrin ligand to the azides in APP.

In a series of parallel experiments, we coated glass slides with PLL-g-PEG or with APP. The slides were subsequently incubated for one hour with BCN–RGD (100 μM in PBS) and then extensively washed. In addition, a set of APP slides were incubated with just PBS, not containing **5**. After that, we seeded HeLa cells (150 000 in 1 mL DMEM medium) on the three different surfaces and monitored the slides in time using a transmission video microscope (observation typically commenced 30 minutes after seeding). Fig. 6 shows still images from the recorded video microscopy movies (see ESI† for the movie files). Noticeably, for both PLL-g-PEG and unfunctionalised APP, cells did not adhere to the surface and remained suspended in the medium for the full 20 hours of observation. Conversely, the BCN–RGD-conjugated APP slides showed a significant localisation of cells on the surface. Within one hour, the HeLa cells started spreading, and after 90 minutes they were almost fully spread. A high level of cell proliferation was observed as could be deduced from the complete confluence of

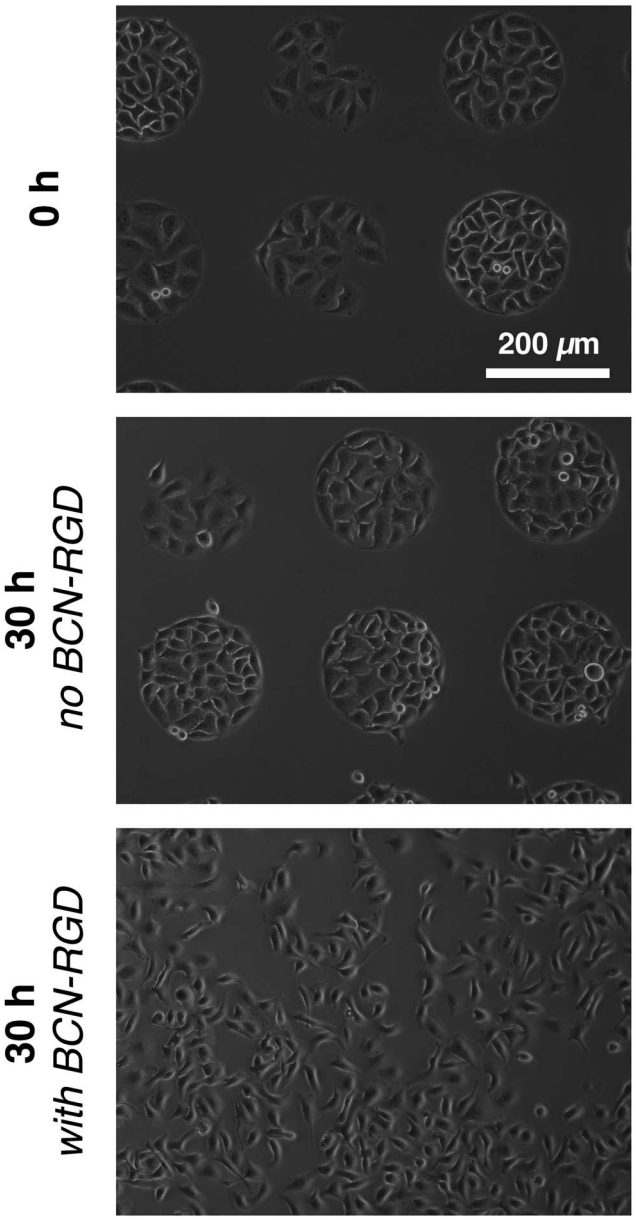


Fig. 7 Transmission micrographs of HeLa cells seeded on 200 μm fibronectin disks. The disks are embedded in APP, which confines the cells. At $T = 0$ h, the APP was treated with BCN–RGD in PBS, or it was incubated with pure PBS. Incubation with BCN–RGD caused the cells to migrate, spreading onto the newly available space. Without this treatment, the cells remained confined within their disks for the full 30 hours.

Published on 05 July 2012 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C2SC20652H
Downloaded by Radboud Universiteit Nijmegen on 19 July 2012

cells towards the end of the 20 hour observation period. The obtained results clearly demonstrate that APP can be combined with BCN-linked cyclic RGD peptides to arrest complex biological systems such as cells, and stimulate their adhesion and proliferation.

Cell release from confinement

In combination with BCN–RGD, APP offers the unique opportunity to provide a cell-repellent surface that can undergo post-modification under physiological conditions. To leverage this ability, we performed cell migration studies. These studies are of distinct interest to cell biologists who study motility, for example in the context of wound healing.[36] Conventional migration assays involve confluent monolayers of cells that start migrating after either a mechanical barrier is removed, or after a part of the monolayer is physically damaged and scraped away. These experiments are prone to artefacts caused by dead cell debris or surface irregularities.[37] We envision the culturing of cells on photopatterned APP, which is then made adherent to cells by the *in vitro* reaction with BCN–RGD. This experimental procedure requires a material that is cell repellent, to allow the original cell pattern to be formed within confinement, but it also calls for bio-compatible reactivity, to allow RGD-conjugation to the surface. APP complies to these criteria.

HeLa cells were seeded on a surface of 200 μm fibronectin disks in a matrix of APP. The cells were allowed to proliferate to fill the available space on the disks. Migration was initiated by the replacement of the cell culture medium by BCN–RGD solution (100 μM in PBS). The conjugation was allowed to proceed for one hour at 37 °C under a 5% CO_2 atmosphere, after which the reactive solution was replaced by fresh cell culture medium. After 30 hours, the cells were observed by light microscopy. As shown in Fig. 7, HeLa cells have left the original disk pattern when BCN–RGD was applied. In experiments where no migration trigger was given, where PLL-g-PEG was used instead of APP, or where unmodified RGD was used instead of BCN–RGD, the cells remained confined within their disks (see ESI†). This result showcases the ability of APP to exhibit a dual nature: without BCN–RGD present, it can be considered inert, whereas post-modification can convert it into a tailored surface coating.

Conclusions

We have introduced APP as a new material for the efficient PEGylation of a variety of surfaces without requiring specialist experience or equipment. The azides in APP can be varied in density, and allow for the orthogonal, one-step conjugation of various BCN-linked molecules introducing a multitude of functionality on an anti-fouling background. The combination of APP and BCN-containing entities offers a highly convenient strategy for fast and efficient surface engineering, which should make protein-resistant surfaces with biocompatible and specific reactivity available to specialists and non-specialists alike.

Acknowledgements

The authors thank Emmanuel Terriac, Daria Bonazzi and Eloise Chevallier for technical assistance, and Paolo Maiuri for valuable discussions. We thank Dennis Löwik for his kind donation of protected c[RGDfK]. This work was supported by a grant from the Fondation pour la recherche médicale (J.J.) and the ENS bourse postdoctoral (S.v.D.).

Notes and references

‡ BCN-derivatives are available from Synaffix B.V., Nijmegen, Netherlands.

1 R. Marie, J. P. Beech, J. Vörös, J. O. Tegenfeldt and F. Höök, *Langmuir*, 2006, **22**, 10103.
2 J. Blümmel, N. Perschmann, D. Aydin, J. Drinjakovic, T. Surrey, M. Lopez-Garcia, H. Kessler and J. P. Spatz, *Biomaterials*, 2007, **28**, 4739.
3 A. Azioune, M. Storch, M. Bornens, M. Thery and M. Piel, *Lab Chip*, 2009, **9**, 1640.
4 G. L. Kenausis, J. Voros, D. L. Elbert, N. Huang, R. Hofer, L. Ruiz-Taylor, M. Textor, J. A. Hubbell and N. D. Spencer, *J. Phys. Chem. B*, 2000, **104**, 3298.
5 N.-P. Huang, R. Michel, J. Voros, M. Textor, R. Hofer, A. Rossi, D. L. Elbert, J. A. Hubbell and N. D. Spencer, *Langmuir*, 2001, **17**, 489.
6 J. T. Wilson, W. Cui, V. Kozlovskaya, E. Kharlampieva, D. Pan, Z. Qu, V. R. Krishnamurthy, J. Mets, V. Kumar, J. Wen, Y. Song, V. V. Tsukruk and E. L. Chaikof, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 7054.
7 L. A. Canalle, S. S. van Berkel, L. T. de Haan and J. C. M. van Hest, *Adv. Funct. Mater.*, 2009, **19**, 3464.
8 J. M. Spruell, M. Wolffs, F. A. Leibfarth, B. C. Stahl, J. Heo, L. A. Connal, J. Hu and C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 16698.
9 S. Arumugam, S. V. Orski, J. Locklin and V. V. Popik, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **134**, 179.
10 X. Deng, C. Friedmann and J. Lahann, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, 6522.
11 M. Kato and M. Mrksich, *Biochemistry*, 2004, **43**, 2699.
12 C. Wendeln, I. Singh, S. Rinnen, C. Schulz, H. F. Arlinghaus, G. A. Burley and B. J. Ravoo, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 2479.
13 S. Bräse, C. Gil, K. Knepper and V. Zimmermann, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 5188.
14 M. F. Debets, C. W. van der Doelen, F. P. J. T. Rutjes and F. L. van Delft, *ChemBioChem*, 2010, **11**, 1168.
15 S. F. M. van Dongen, R. L. M. Teeuwen, M. Nallani, S. S. van Berkel, J. J. L. M. Cornelissen, R. J. M. Nolte and J. C. M. van Hest, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 20.
16 T. Vong, S. Schoffelen, S. F. M. van Dongen, T. A. van Beek, H. Zuilhof and J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.*, 2011, **2**, 1278.
17 S. Schoffelen, M. B. van Eldijk, B. Rooijakkers, R. Raijmakers, A. J. R. Heck and J. C. M. van Hest, *Chem. Sci.*, 2011, **2**, 701.
18 M. I. Sanchez, O. Vazquez, J. Martinez-Costas, M. E. Vazquez and J. L. Mascarenas, *Chem. Sci.*, 2012, **3**, 2383.
19 K. L. Kiick, E. Saxon, D. A. Tirrell and C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 19.
20 D. C. Dieterich, A. J. Link, J. Graumann, D. A. Tirrell and E. M. Schuman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2006, **103**, 9482.
21 J. Xie and P. G. Schultz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006, **7**, 775.
22 F. Truong, T. H. Yoo, T. J. Lampo and D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 8551.
23 J. Z. Yao, C. Uttamapinant, A. Poloukhtine, J. M. Baskin, J. A. Codelli, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, V. V. Popik and A. Y. Ting, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 3720.
24 R. Manova, T. A. van Beek and H. Zuilhof, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 5428.
25 J. Dommerholt, S. Schmidt, R. Temming, L. J. A. Hendriks, F. P. J. T. Rutjes, J. C. M. van Hest, D. J. Lefeber, P. Friedl and F. L. van Delft, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 9422.
26 M. F. Debets, S. S. van Berkel, J. Dommerholt, A. T. Dirks, F. P. J. T. Rutjes and F. L. van Delft, *Acc. Chem. Res.*, 2011, **44**, 805.
27 Y. Xia, Y. Li, A. O. Burts, M. F. Ottaviani, D. A. Tirrell, J. A. Johnson, N. J. Turro and R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 19953.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2012

28 V. R. Krishnamurthy, J. T. Wilson, W. Cui, X. Song, Y. Lasanajak, R. D. Cummings and E. L. Chaikof, *Langmuir*, 2010, **26**, 7675.
29 N.-P. Huang, J. Vörös, S. M. De Paul, M. Textor and N. D. Spencer, *Langmuir*, 2001, **18**, 220.
30 F. G. Giancotti and E. Ruoslahti, *Science*, 1999, **285**, 1028.
31 S. J. Xiao, M. Textor, N. D. Spencer and H. Sigrist, *Langmuir*, 1998, **14**, 5507.
32 S. Tosatti, S. M. De Paul, A. Askendal, S. VandeVondele, J. A. Hubbell, P. Tengvall and M. Textor, *Biomaterials*, 2003, **24**, 4949.
33 S. VandeVondele, J. Vörös and J. A. Hubbell, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, **82**, 784.
34 C. M. Kolodziej, S. H. Kim, R. M. Broyer, S. S. Saxer, C. G. Decker and H. D. Maynard, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **134**, 247.
35 R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S. L. Goodman, A. Jonczyk and H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 7461.
36 C. D. Nobes and A. Hall, *J. Cell Biol.*, 1999, **144**, 1235.
37 A. Schilling-Schön, U. Pleyer, C. Hartmann and P. W. Rieck, *Exp. Eye Res.*, 2000, **71**, 583.

Published on 05 July 2012 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/C2SC20652H
Downloaded by Radboud Universiteit Nijmegen on 19 July 2012