



HAL
open science

Cytodiérèse des cellules épithétiales et maintien de l'intégrité du tissu chez *Drosophila melanogaster*

Emeline Daniel

► **To cite this version:**

Emeline Daniel. Cytodiérèse des cellules épithétiales et maintien de l'intégrité du tissu chez *Drosophila melanogaster*. Biologie cellulaire. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1B049 . tel-01928606

HAL Id: tel-01928606

<https://theses.hal.science/tel-01928606>

Submitted on 20 Nov 2018

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.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1
Mention : Biologie

Ecole doctorale Biologie Santé

présentée par

Emeline Daniel

Préparée à l'unité de recherche 6290 IGDR
Institut de Génétique et Développement de Rennes
Université de Rennes 1

**Cytodiérèse des
cellules épithéliales et
maintien de l'intégrité
du tissu chez
*Drosophila
melanogaster***

**Thèse soutenue à Rennes
le 15 Décembre 2017**

devant le jury composé de :

André LE BIVIC

Directeur de recherche, IBDM Marseille / *rapporteur*

Magali SUZANNE

Directeur de recherche, CBI Toulouse / *rapporteur*

Juliette MATHIEU

Chargé de recherche, Institut Curie Paris /
examineur

Jean-Pierre TASSAN

Chargé de recherche, IGDR Rennes / *examineur*

Roland LE BORGNE

Directeur de recherche, IGDR Rennes / *directeur de
thèse*

Table des matières

I- Introduction.....	6
1- Les cellules épithéliales : des cellules polarisées.....	6
1.1 Les jonctions adhérentes	6
1.2 La barrière de perméabilité chez les vertébrés	9
1.2.1 Les jonctions serrées : composition.....	9
1.2.2 Les jonctions serrées : structure.....	12
1.2.3 Les jonctions serrées : fonctions	14
1.2.4 Les jonctions serrées : formation.....	14
1.3 La barrière de perméabilité chez <i>Drosophila melanogaster</i>	15
1.3.1 Les jonctions septées : composition.....	16
1.3.2 Les jonctions septées : structure	24
1.3.3 Les jonctions septées : fonctions.....	24
1.3.4 Les jonctions septées : formation	24
1.4 Les jonctions tri-cellulaires	25
1.4.1 Dans le plan des jonctions adhérentes.....	25
1.4.2 Dans le plan des jonctions serrées/septées	26
1.4.3 Structure	29
1.4.4 Fonctions.....	31
1.5 Etablissement et maintien de la polarité apico-basale	31
2- La cytodièrese.....	36
2.1 Description	36
2.2 Le fuseau central	36
2.3 Formation du sillon de division	38
2.4 Structure et dynamique de l'anneau contractile	41
2.4.1 Assemblage.....	41
2.4.2 Structure.....	41
2.4.3 Dynamique	41

2.5	Contrôle de la cytodierèse et régulation de l'abscission	44
2.5.1	Structure du midbody	44
2.5.2	Abcission	45
2.5.3	Recrutement des médiateurs de l'abscission	47
2.5.4	Régulation de l'abscission	48
3-	La machinerie ESCRT	52
3.1	Les différents complexes ESCRT	52
3.1.1	ESCRT-0	52
3.1.2	ESCRT-I	53
3.1.3	ESCRT-II	53
3.1.4	ESCRT-III	54
3.1.5	Vps4	55
3.2	D'autres rôles des ESCRTs	57
3.2.1	Bourgeonnement de virus	57
3.2.2	Réparation membranaire	58
3.2.3	Cytodierèse et abcission	59
4-	La cytodierèse des cellules épithéliales	61
4.1	Orientation de la division	61
4.1.1	Le cytosquelette	61
4.1.2	Les signaux corticaux	62
4.2	Fermeture de l'anneau et positionnement apical du midbody	62
4.3	Les contacts adhésifs	66
4.3.1	Remodelage des jonctions adhérentes	66
4.3.2	Mise en place des nouvelles jonctions	68
4.3.3	Le rôle du midbody	68
4.4	La barrière de perméabilité	71
4.5	Les jonctions tri-cellulaires	71
4.6	Transmission de la polarité	72

II- Objectifs de la thèse et résultats	74
1- Objectifs de la thèse	74
2- Outils	75
3- Résultats	76
3.1 PARTIE I : L'abscission est retardée dans les cellules épithéliales malgré le recrutement de ESCRT-III.....	78
3.1.1 La maturation du midbody lors de la cytodierèse des cellules épithéliales.	78
3.1.2 Le recrutement de ESCRT-III n'est pas corrélé à l'abscission dans les cellules épithéliales	81
3.1.3 L'abscission prend place avant la division	82
3.1.4 Un autre rôle des ESCRTs dans la division des cellules épithéliales	82
3.2 PARTIE II : L'assemblage orienté des jonctions septées permet de conserver l'intégrité du tissu épithélial au cours de la cytodierèse	94
3.2.1 Les cellules voisines restent connectées au niveau du midbody.....	94
3.2.2 Les nouvelles jonctions septées se forment au-dessus du midbody	95
3.2.3 Des jonctions tri-cellulaires se forment à proximité du midbody	97
3.2.4 L'assemblage des jonctions septées a lieu sous les jonctions adhérentes.	98
3.2.5 Corrélation entre l'assemblage des jonctions septées et la vitesse de migration du midbody	100
III- Conclusion Générale	117
IV- Discussion.....	119
1- L'abscission est effective lorsque les cellules épithéliales se préparent à une nouvelle division.....	119
2- En absence de Shrb, l'isolation cytoplasmique a bien lieu.....	120
3- Un nouveau rôle des ESCRTs dans l'assemblage ou le maintien des jonctions septées.	122
4- Des jonctions tri-cellulaires stables sont assemblées au-dessus du midbody.	123
5- Un ménage à quatre qui permet le maintien de l'intégrité du tissu épithélial. .	124

6- La vitesse de migration du midbody est dictée par l'assemblage orienté des jonctions septées.	126
7- La désorganisation des jonctions septées affecte la vitesse de migration du midbody.	127
8- Un processus conservé chez les vertébrés.	129
V- Matériels et méthodes.....	131
VI- Références.....	136

I- Introduction

1- Les cellules épithéliales : des cellules polarisées

Les tissus épithéliaux, présents chez tous les métazoaires, sont une barrière physique et chimique entre les milieux intérieur et extérieur de l'organisme. En tapissant les surfaces externes et les cavités de l'organisme, ils participent à l'échange de molécules et d'ions, régulant ainsi l'homéostasie. Pour accomplir cette fonction, les cellules sont polarisées selon un axe apico-basal et leur membrane plasmique peut être divisée en plusieurs domaines (Figure A). Le domaine apical fait directement face au milieu extérieur, le domaine latéral est en contact avec les cellules voisines tandis que le domaine basal est ancré sur la lame basale. La composition des membranes et du cytoplasme des cellules épithéliales varie selon l'axe apico-basal mais également dans le plan de l'épithélium. Dans le plan de l'épithélium, nous pouvons distinguer deux grands types de jonctions : les jonctions bicellulaires entre deux cellules voisines et les jonctions tri-cellulaires au contact de trois cellules (Figure B).

1.1 Les jonctions adhérentes

La barrière physique du tissu épithélial est assurée par la forte cohésion entre les cellules au niveau de la zonula adherens (Figure C) formant une ceinture de jonctions adhérentes à l'interface entre les domaines apical et latéral (Meng et Takeichi, 2009 ; Harris et Tepass, 2010). Le rôle des jonctions adhérentes est assuré par la protéine transmembranaire E-Cadhérine (E-Cad) liée au cytosquelette d'actine via son interaction avec β -caténine (β -cat), et α -caténine (α -cat) (Cavey et Lecuit, 2009 ; Drees et al, 2005 ; Nishimura et Takeichi, 2009 ; Yamada et al., 2005). Les molécules de E-Cadhérine s'associent en *trans* (entre deux cellules voisines) par des interactions homophiliques, leur conférant ainsi leurs propriétés adhésives et sélectives. Elles interagissent également en *cis* (sur la même membrane), permettant probablement leur regroupement entre elles.

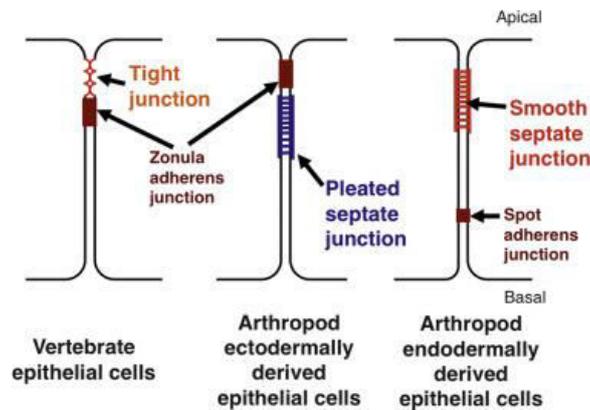


Figure A : Les cellules épithéliales sont polarisées selon l'axe apico-basal. Comparaison de l'organisation apico-basale des cellules épithéliales de vertébrés (gauche) ou d'arthropodes (droite). Les jonctions serrées (tight junction) sont localisées en apical des jonctions adhérentes (zonula adherens junction) chez les vertébrés. Chez les arthropodes, les jonctions septées plissées (pleated septate junction) se forment sous les jonctions adhérentes dans les cellules dérivant de l'ectoderme. Dans les cellules dérivant de l'endoderme, des jonctions septées lisses (smooth) se forment à la membrane apico-latérale. Ces cellules ne présentent pas de ceinture de jonctions adhérentes mais des patches de jonctions se forment entre les cellules sur la membrane baso-latérale. (Adapté de Izumi et Furuse, 2014).

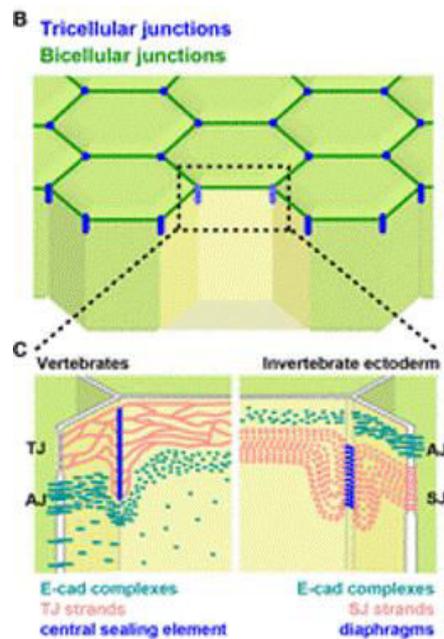


Figure B : Des jonctions tri-cellulaires se forment au contact de trois cellules épithéliales. Chez les vertébrés et les invertébrés, dans le plan de l'épithélium, deux types de jonctions prennent place. Les jonctions bicellulaires séparent deux cellules, tandis qu'au contact de trois cellules se forment des jonctions tri-cellulaires (B). D'un point de vue structural, chez les vertébrés, un élément central d'étanchéité se forme aux jonctions tri-cellulaires. Chez les invertébrés, les jonctions tri-cellulaires prennent la forme de diaphragmes entre les trois cellules (C). (Adapté de Higashi et Miller, 2017).

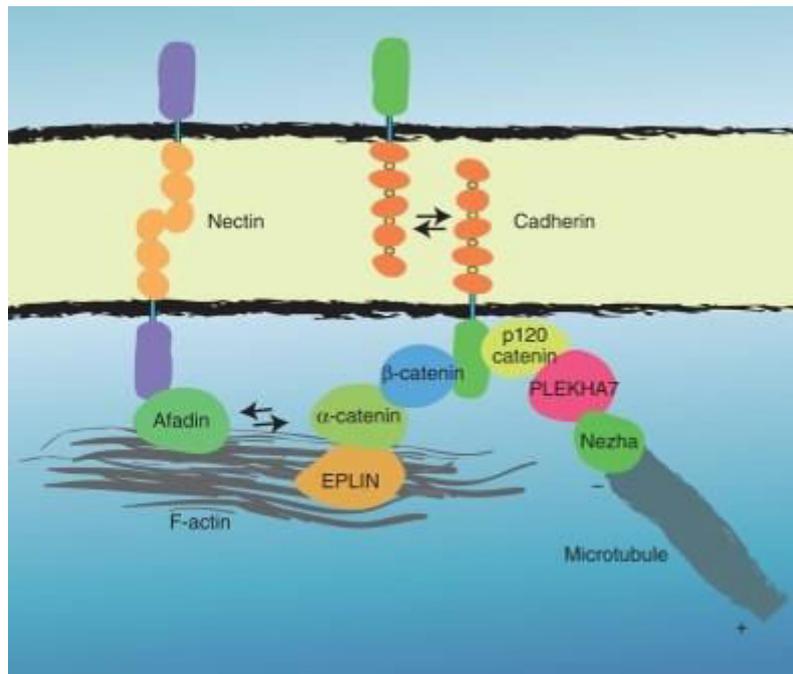


Figure C : Les jonctions adhérentes. Représentation schématique des différents constituants de la ceinture de jonctions adhérentes. Ces constituants peuvent varier selon le type de jonctions adhérentes. La protéine transmembranaire E-Cadhérine (Cadherin) est liée au cytosquelette d'actine (F-actin) via son interaction avec β -caténine (β -catenin), et α -caténine (α -catenin). (De Meng et Takeichi, 2009).

1.2 La barrière de perméabilité chez les vertébrés

Chez les vertébrés, les jonctions intercellulaires regroupent les jonctions adhérentes, les jonctions serrées, les desmosomes et les jonctions communicantes (Gap junctions). Dans les cellules épithéliales, les jonctions adhérentes et serrées sont morphologiquement et biochimiquement différentes malgré le fait qu'elles soient issues d'une même jonction primordiale (Cerejido et al., 1971 ; Balda et al., 1991). Les jonctions serrées forment un domaine apico-latéral et sont localisées en apical des jonctions adhérentes. Ces deux types de jonctions sont associées au cytosquelette d'actine. Au niveau baso-latéral, les desmosomes sont eux liés aux filaments intermédiaires. Enfin Les jonctions communicantes consistent en de petits canaux permettant la communication entre cellules voisines (Figure D).

1.2.1 Les jonctions serrées : composition

Les jonctions serrées sont composées de plus de quarante protéines transmembranaires et cytosoliques (Figure E) (Schneeberger et Lynch, 2004) mais les protéines du complexe central, responsable de la fonction de barrière de perméabilité, sont les claudines (Furuse et al., 1998). Les claudines sont des protéines qui prennent part à la diffusion sélective des ions entre les membranes cellulaires par le biais de pores paracellulaires (Tamura et Tsukita, 2014). Ces protéines traversent quatre fois la membrane plasmique, formant ainsi deux boucles extra-cellulaires. La première boucle extra-cellulaire contient un motif d'acides aminés permettant des interactions en *cis* ou *trans* via des ponts disulfures entre Cystéines de claudines voisines. La partie C-terminale est quant à elle importante pour la localisation apicale dans les jonctions serrées (Ruffer et Gerke, 2004). Les protéines à domaines Marvel (Occludine/ Tricelluline/ MarvelD3) présentent quatre hélices transmembranaires et sont impliquées dans la juxtaposition des membranes. Les occludines sont notamment importante pour la régulation de la migration en *trans* des neutrophiles (Huber et al., 2000). Une

déplétion de ces protéines entraîne également une mauvaise localisation des tricellulines qui comme leur nom l'indique sont enrichies aux jonctions tricellulaires (voir 1.4.2). La troisième protéine à domaine Marvel, MarvelD3, est connue pour être impliquée dans la régulation de la migration cellulaire et de la prolifération des cellules en culture. MarvelD3 module l'activation des kinases JNK en inhibant MEKK1, composant de la voie de signalisation JNK. D'autres études seront nécessaires pour affiner le rôle de ces protéines au niveau tissulaire. Enfin les protéines JAMs sont des protéines d'adhésion comportant des domaines immunoglobuline et entrant en jeu dans différentes voies de signalisation impliquées dans le remodelage des épithélia.

Les jonctions serrées sont aussi composées d'une plaque cytoplasmique, un réseau protéique complexe qui interagit avec les domaines cytoplasmiques des protéines membranaires ainsi qu'avec l'Actine filamenteuse (Actine-F) et les microtubules (Figure E). Ces principaux composants sont des protéines avec de nombreux domaines d'interaction protéine-protéine. Parmi eux, la première protéine des jonctions serrées identifiée, ZO-1. Un rôle important de ZO-1 consiste en l'organisation spatiale des tensions présentes aux sites d'adhésion (Tornavaca et al., 2015). Les protéines ZO-1 interagissent notamment avec les claudines *via* des domaines PDZ (domaine d'homologie PSD95, DlgA, ZO-1) présents à leur partie N-terminale et C-terminale respectives (Itoh et al., 1999). Cette interaction permettrait le recrutement correct des claudines aux jonctions serrées (McCarthy et al., 2000). Ainsi, de très nombreuses protéines adaptatrices à domaine PDZ (ZO-2, ZO-3, MUPP1, PATJ, Par3...) prennent part aux interactions protéiques de la plaque cytoplasmique des jonctions serrées. D'autres protéines adaptatrices, la cinguline et la para-cinguline, lient de nombreuses protéines jonctionnelles mais aussi l'Actine et dans le cas de la cinguline, les microtubules. La plaque cytoplasmique contient également de nombreuses protéines de signalisation telles que des protéines kinases, des phosphatases, des protéines liant le GTP et des régulateurs transcriptionnels et

post-transcriptionnels (Zihni et al., 2014 ; Gonzales-Mariscal et al., 2014 ; Quiros et Nusrat, 2014).

1.2.2 Les jonctions serrées : structure

Les jonctions serrées ont d'abord été décrites en microscopie électronique comme des points de fusion entre les membranes plasmiques de cellules voisines (Farquhar et Palade, 1963). Plus tard, par cryofracture, les jonctions serrées apparaissent sous forme d'un réseau continu de fibres ramifiées qui entoure l'apex de chaque cellule épithéliale (Staehein, 1973). Ces observations sont à l'origine d'un débat entre deux modèles quant à la structure des jonctions serrées (Figure F). Le premier modèle est un modèle 100% protéines dans lequel la barrière de diffusion est établie par les protéines transmembranaires qui forment des complexes protéiques intercellulaires entre les membranes plasmiques de cellules voisines qui présentent une configuration standard de bicouches lipidiques. Dans ce modèle, chaque contact est composé de quatre polymères de claudines, deux par cellule, qui interagissent par leur domaine extracellulaire. Le second modèle est un modèle hybride protéines-lipides incluant des contacts membrane-membrane entre les cellules voisines. Il propose que chaque site de contact soit une fusion des hémimembranes de cellules voisines formant un cylindre de micelles lipidiques inversés dans lequel se trouvent les protéines transmembranaires. Ce modèle est basé sur la démonstration que des liposomes dépourvus de protéines sont capables de former des structures similaires aux jonctions serrées (Kachar et Reese, 1982). Récemment, la structure de la claudine-15 (Suzuki et al., 2014) tente à faire pencher la balance vers le modèle protéines seules. Toutefois jusqu'à présent, aucun consensus n'a été atteint.

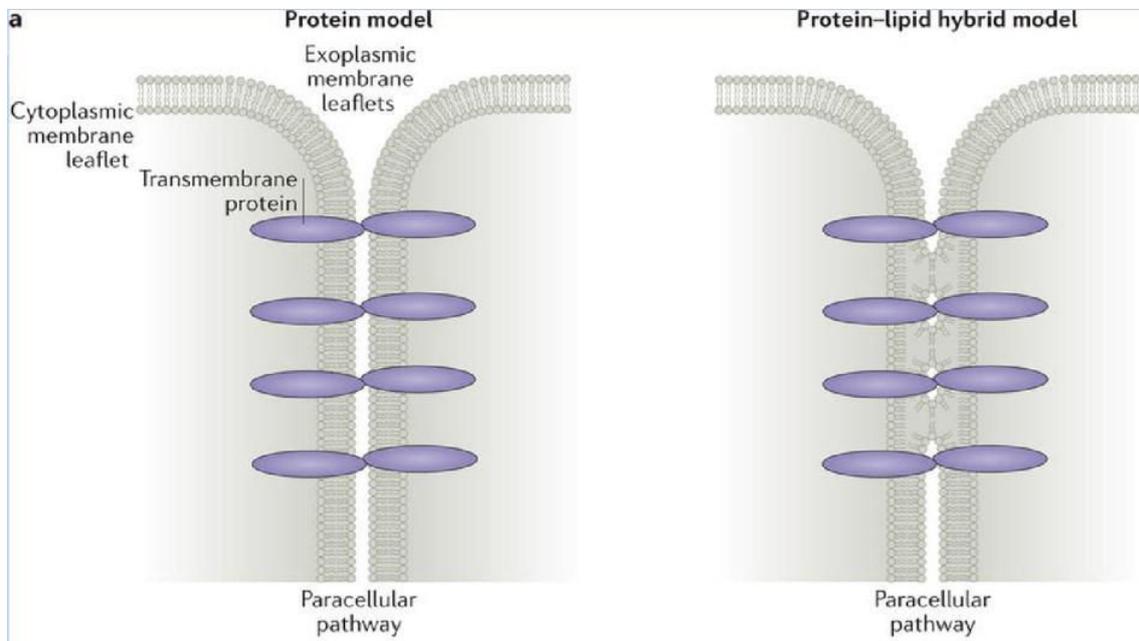


Figure F : Deux modèles de structures des jonctions serrées. Le modèle 100% protéines propose que les interactions protéiques intercellulaires forment la barrière de perméabilité entre deux membrane plasmique, formées d'une bicouche lipidique classique. Dans le modèle hybride protéine-lipide, la continuité de la bicouche lipidique est interrompue par des micelles lipidiques inversés formant des cylindres, stabilisés par les protéines transmembranaires. (Adapté de Zihni et al., 2016)

1.2.3 Les jonctions serrées : fonctions

Les jonctions serrées ont deux rôles majeurs de barrière : l'un de barrière de perméabilité paracellulaire, l'autre de barrière de diffusion intramembranaire. La barrière de perméabilité paracellulaire est semi-permissive et peut laisser passer, selon le tissu, des ions et des petites molécules non chargées dans des pores de 4 à 8 Å. La sélection des molécules peut aussi être basée sur la taille des molécules, laissant passer des molécules plus larges, de 30 à 60 Å. Ces deux types de perméation basés sur la charge ou sur la taille sont régulés par des mécanismes différents et peuvent l'être de manière opposée (Steed et al., 2010 pour revue). Outre leur rôle de barrière, les jonctions serrées sont également des plateformes de signalisation importante. En plus d'être impliquées dans l'établissement et le maintien de la polarité apico-basale (lire ci-dessous), elles jouent un rôle de transmission des signaux vers l'intérieur de la cellule, régulant ainsi le cytosquelette, l'expression de gènes, la prolifération et la différenciation cellulaires.

1.2.4 Les jonctions serrées : formation

L'assemblage des jonctions serrées est étroitement lié à la polarité apico-basale. Durant les premières étapes de leur formation, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées ne sont pas encore clairement bien définies et sont issues de la même jonction primordiale. ZO-1, composant des jonctions serrées, forme un complexe avec α -caténine, composant des jonctions adhérentes. Ce complexe est recruté au site de formation des nouvelles jonctions, couplant ainsi l'assemblage des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. La formation des jonctions adhérentes et serrées matures nécessite ensuite l'activation de nombreux mécanismes de signalisation, parmi lesquels sont impliquées PKC (proteine kinase C), PKA, AMPK (AMP-activated protein kinase), des phosphatases, des petites GTPases et des GTPases hétérotrimérique (Balda et al., 1991 ; Gonzales-Mariscan et al., 2014 ; Quiros et Nusrat, 2014 ; Zihni et al.,

2014). Les Rho GTPases contrôlent la formation des jonctions serrées par trois mécanismes majeurs : elles stimulent la polymérisation de l'actine dans les contacts cellulaires initiaux par l'intermédiaire de Rac1-WAVE-Arp2/3 et Cdc42-N-WASP-Arp2/3. Ceci permet la stabilisation des premiers contacts E-Cadhérine des jonctions adhérentes. Elles stimulent l'activité de la Myosine II, favorisant ainsi l'expansion des jonctions adhérentes. Et enfin elles participent à l'assemblage des complexes de polarité résultant à la formation des jonctions serrées et la mise en place de la polarité apico-basale. Au cours de l'assemblage des jonctions septées, ZO-1 et Cingulin recrutent respectivement RhoGEF11 et p114RhoGEF (Terry et al., 2011 ; Itoh et al., 2012). Ces deux GEF sont spécifique pour RhoA qui joue un rôle dans le remodelage et l'organisation de l'actine. p114RhoGEF se lie à Myosine II et ROCK, constituant ainsi un complexe prêt pour l'activation de RhoA. ROCK phosphoryle MLC et inhibe la phosphatase de la chaîne légère de myosine, MYPT (Watanabe et al., 1999). D'un autre côté, Cdc42, associée à la protéine de polarité Par6, stimule l'activité de aPKC et la phosphorylation des protéines de jonctions septées telles que JAM-A et ZO-2, ce qui stabilise leur localisation dans les jonctions (Wallace et al., 2010 ; Quiros et al., 2013).

1.3 La barrière de perméabilité chez *Drosophila melanogaster*

Chez *Drosophila melanogaster*, organisme invertébré de la famille des diptères, les jonctions intercellulaires sont regroupées en 3 groupes : le domaine sub-apical, les jonctions adhérentes et les jonctions septées (Figure G). Chez la drosophile, deux types de jonctions septées sont décrites : les jonctions septées plissées et les jonctions septées lisses. Les jonctions septées plissées sont retrouvées dans les épithélia dérivés de l'ectoderme tels que l'épiderme, la trachée ou les disques imaginaux. Les jonctions septées lisses sont, elles, retrouvées dans les épithélia dérivés de l'endoderme. Chez la drosophile, les jonctions septées sont localisées à la membrane latérale, juste sous la ceinture des jonctions adhérentes des cellules épithéliales dérivées de l'ectoderme. Les

jonctions septées lisses sont localisées dans la région apico-latérale des cellules épithéliales dérivées de l'endoderme, qui ne présentent pas de ceinture de jonctions adhérentes mais des points de contact adhésif (Tepass et Hartenstein, 1994). Dans la suite de ce manuscrit, nous nous concentrerons uniquement sur les jonctions septées plissées.

1.3.1 Les jonctions septées : composition

A l'heure actuelle, plus de 20 composants des jonctions septées ont été décrits, incluant des protéines transmembranaires, des protéines cytoplasmiques et des protéines régulant l'assemblage de ces jonctions (Izumi et Furuse, 2014).

Parmi les protéines transmembranaires, nous recensons Neuroglian, Neurexin-IV, Contactin, les sous-unités α et β de la pompe à sodium Na^+ / K^+ ATPase (ATP α et Nervana2), Megatrachea, Sinuous, Kune-kune, Fasciclin II et Fasciclin III, Melanotransferrin, Lachesin, Macroglobulin, Gliotactin et Bark.

Neuroglian, Neurexin-IV et Contactin. (Figure H) Ces trois protéines sont conservées au sein de jonctions de type septé présentes chez les vertébrés : les jonctions paranodales (Salzer, 2003 ; Faivre-Sarrailh et al., 2004). Neuroglian (Nrg) présente un seul domaine transmembranaire et contient cinq domaines de type immunoglobuline (Ig) et cinq domaines fibronectine (Barnejee et al., 2006). Neuroglian forme un complexe avec Coracle (Cora) (protéine cytoplasmique, voir ci-dessous), Neurexin-IV et Na^+ / K^+ ATPase (Genova et Fehon, 2003 ; Barnejee et al., 2006). Neurexin-IV (Nrx-IV) est une protéine transmembranaire de la famille Caspr (Contactin-associated-protein). Elle présente un seul domaine transmembranaire, dans sa partie cytoplasmique, un domaine PDZ (PSD-95-Dlg-ZO-1) et dans sa partie extracellulaire, cinq domaines Laminin G, deux domaines de répétitions EGF et un domaine Discoïdin (Barnejee et al., 2006). Neurexin-IV interagit directement avec Coracle via son domaine cytoplasmique (Ward et al., 1998). Contactin (Cont) est quant à elle une protéine de surface, ancrée à la

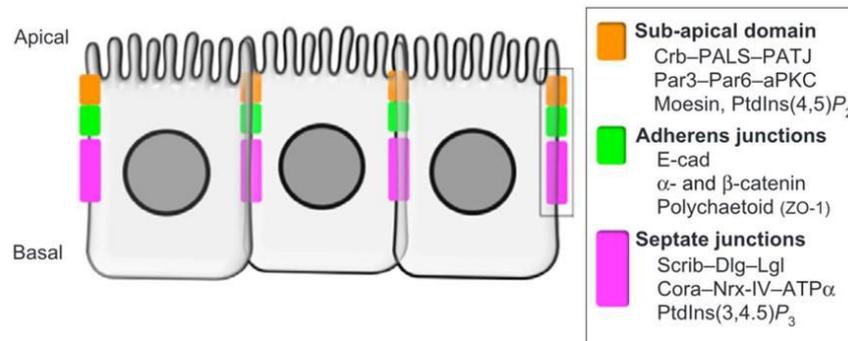


Figure G : Les jonctions intercellulaires chez *Drosophila melanogaster*. Chez la drosophile, les jonctions adhérentes (vert) séparent le domaine subapical (orange) du domaine basolatéral où s'organisent les jonctions septées (rose). (Adapté de Le Bras et Le Borgne, 2014).

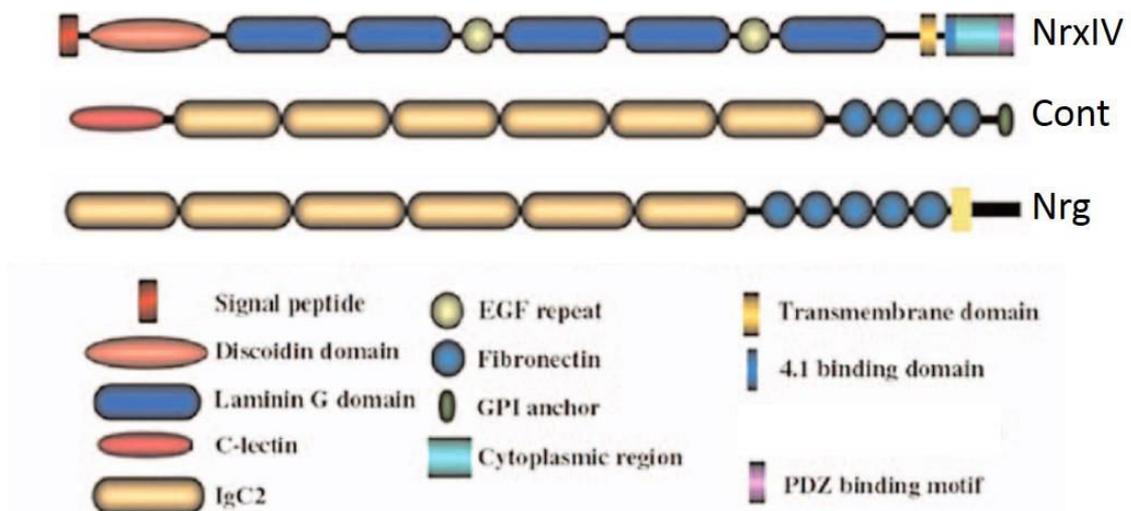


Figure H : Composition moléculaire de Neurexin IV, Contactin et Neuroglian. Nrx-IV et Nrg sont deux protéines transmembranaires présentant un seul domaine transmembranaire. Contactin est une protéine de surface présentant un domaine d'ancrage à la membrane (GPI anchor). (Adapté de Banerjee et al., 2006).

membrane plasmique par un domaine GPI (Glycosyl-phosphatidyl-inositol) (Faivre-Sarrailh et al., 2004). Elle possède de plus quatre domaine fibronectin, six domaines de type immunoglobuline (Ig) et un domaine C-lectin. Contactin forme un complexe avec Nr_x-IV et Nrg permettant l'adhésion cellule-cellule via des interactions hétérophiliques entre Cont et Nrg. La déplétion de Nrg, Nr_x-IV ou Cont cause des défauts dans la fonction de barrière de perméabilité des jonctions septées. Ces trois composants jouent donc un rôle majeur dans cette fonction.

Na⁺ / K⁺ ATPase. La pompe à sodium Na⁺ / K⁺ ATPase est un hétérodimère composé des sous-unités α (ATPα) et β (Nervana2) (Figure I). ATPα est une large sous-unité catalytique à plusieurs domaines transmembranaires tandis que Nervana2 est la sous-unité régulatrice et ne présente qu'un seul domaine transmembranaire. Cette pompe utilise l'énergie issue de la transformation de l'ATP pour transporter les ions sodium vers le milieu extracellulaire et les ions potassium vers le milieu intracellulaire, contre leur gradient de concentration (Blanco et Mercer, 1998 ; Mobasher et al., 2000). Elle permet le maintien ou le retour au potentiel de repos des cellules nerveuses, musculaires et cardiaques. Si les deux sous-unités sont nécessaires au maintien de la barrière de perméabilité (Genova et Fehon, 2003 ; Paul et al., 2003), l'activité de transport d'ions n'est pas requise à la formation des jonctions septées (Paul et al., 2007).

Megatrachea, Sinuous et Kune-kune. (Figure J) Ces trois protéines font partie de la famille des claudines. Elles présentent toutes trois la même structure à quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires. Megatrachea (Mega) est essentielle à la localisation correcte des composants de jonctions septées, notamment Nr_x-IV et Cora. Elle est importante pour la morphologie normale des jonctions mais n'est pas indispensable à la polarité apico-basale ou à l'intégrité de l'épithélium (Behr et al., 2003). Contrairement à Mega, Sinuous (Sinu) est nécessaire à l'organisation des jonctions septées et à la barrière de perméabilité paracellulaire (Wu et al., 2004). Enfin, plus récemment, il a été mis en évidence que la troisième claudine connue chez les invertébrés, Kune-kune

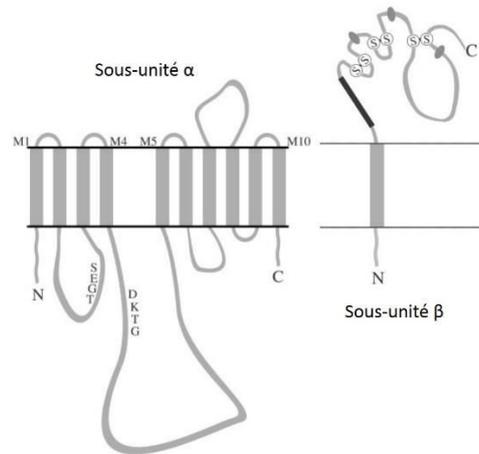


Figure I : Représentation schématique des sous-unités α et β de la pompe Na^+ / K^+ ATPase. La sous-unité α est la sous unité catalytique et la sous unité β est la sous unité régulatrice de la pompe à sodium Na^+ / K^+ ATPase. L'activité de transport d'ions n'est pas requise à la formation des jonctions septées. (Adapté de Kaplan, 2002).

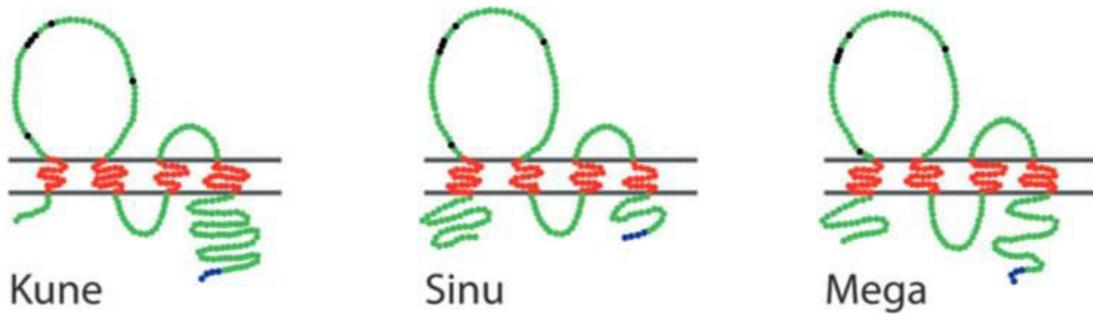


Figure J : Représentation schématique des protéines de la famille des claudins. Kune-Kune (Kune), Sinuous (Sinu) et Megatrachae (Mega) sont des protéines transmembranaires de la famille des claudines. Elles présentent quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires. (Adapté de Nelson et al., 2010).

(Kune) (Nelson et al., 2010), est essentielle à la fois à la formation et à l'organisation des jonctions septées, jouant ainsi un rôle plus central que les deux autres claudines. Ces trois claudines pourraient avoir un rôle redondant dans l'organisation des jonctions septées chez la drosophile.

Fasciclin II et Fasciclin III. Fasciclin III (Fas3) est une protéine présentant un seul domaine transmembranaire et 3 domaines immunoglobulines (Ig). Elle établit des contacts homophiliques, participant ainsi à l'adhésion entre cellules voisines (Snow et al., 1989). Fas3 est très utilisée comme marqueur des jonctions septées même si toutefois elle n'est pas nécessaire à la formation ni au maintien de l'organisation des jonctions septées (Whitlock, 1993). Fasciclin II (Fas2) présente quant à elle cinq domaines immunoglobulines, trois domaines fibronectine de type 3 et un seul domaine transmembranaire. Elle est, elle aussi, impliquée dans l'adhésion cellule-cellule *via* des interactions homophiliques (Grenningloh et al., 1991).

Lachesin. Lachesin (Lac) est une protéine de surface contenant trois domaines de type immunoglobuline (Ig) et un domaine C-terminal GPI (Llimargas et al., 2004). Lac contribue au contact intercellulaire *via* son activité d'adhésion homophile.

Melanotransferrin. Aussi connue sous le nom de Transferrin 2 (Tsf2), Melanotransferrin (Mtf) est une glycoprotéine de surface ayant la capacité à lier le fer. Elle présente deux domaines de liaison au fer et un domaine d'ancrage GPI. Mtf est retrouvée dans des complexes protéiques avec NrX-IV, Nrg ou Cont. Son rôle est important dans la localisation des composants de jonctions septées et donc dans le maintien de l'intégrité de la barrière de perméabilité. En 2010, Tiklova et al. ont montré son rôle central dans l'assemblage et la maturation des jonctions septées. En effet, en absence de Mtf, la localisation de composants de jonctions septées tels que NrX-IV et Cora est affectée. En revanche, les jonctions adhérentes ne sont pas affectées dans ce mutant. Enfin, les auteurs observent une extension du marquage Mtf vers le pôle basal dans les mutants Cora et ATP α

(Tiklova et al., 2010). Il y a donc une interdépendance entre ces différents composants de jonctions septées.

Macroglobulin complement-related. Macroglobulin complement-related (Mcr) est une protéine transmembranaire appartenant à une famille de protéine TEPs (thioester-containing proteins) préalablement décrite pour son implication dans l'immunité innée (Medzhitov et Janeway, 2002). Chez la drosophile, Mcr est localisée au niveau des jonctions septées où elle joue un rôle dans leur organisation et leur fonction. Mcr et Nrg présentent notamment une interdépendance pour leur localisation aux jonctions septées (Hall et al., 2014).

Les jonctions septées se composent également de protéines cytoplasmiques, parmi lesquelles nous retrouvons Coracle, Yurt, Variscose, Discs large, Lethal giant Larvae et Scribble.

Coracle et Yurt. Coracle (Cora) et Yurt (Yrt) sont deux protéines de la super-famille des protéines 4.1 qui contiennent un domaine FERM (4.1/Ezrin/Radexin/Moesin) (Fehon et al., 1994 ; Chishti et al., 1998 ; Laprise et al., 2009). Elles sont toutes deux nécessaires à la fonction de barrière de perméabilité des jonctions septées. De plus, Cora, Nrx-IV et ATP α d'une part, et Yrt d'autre part, fonctionneraient de manière redondante pour maintenir la polarité épithéliale durant l'organogenèse (Laprise et al., 2009). Yrt est notamment décrit pour réguler négativement la protéine de polarité apicale Crumbs (Laprise et al., 2006).

Variscose. Variscose (Vari) appartient à un sous-groupe de protéines MAGUK (membrane-associated guanylate kinase). Elle présente également un domaine SH3 (Src homology 3) et un domaine PDZ. C'est *via* ce domaine PDZ liant directement la partie C-terminale de Nrx-IV que Vari semble impliqué dans l'assemblage des jonctions septées (Wu et al., 2007 ; Moyer et Jacobs, 2008).

L'ensemble des protéines transmembranaires et cytosoliques décrites ci-dessus sont les composants du complexe stable des jonctions septées. La stabilité de ce complexe a été mise en évidence par des expériences de recouvrement de

fluorescence (Oshima et Fehon, 2011). Le second complexe est le complexe de polarité apico-basale composé des protéines cytoplasmiques Discs large, Lethal giant Larvae et Scribble (Figure K).

Discs large. Discs large (Dlg) est une protéine MAGUK présentant de plus trois domaines PDZ et un domaine SH3. Elle est un des régulateurs de la polarité apico-basale et joue un rôle important dans la mise en place des jonctions septées (Woods and Bryant, 1991).

Lethal (2) giant larvae. Lethal giant larvae (Lgl) présente cinq domaines de répétitions WD-40 (ou WD, ou β -transducin). Lgl est impliquée dans la polarité apico-basale en partie en régulant la distribution de membrane régulée par SNARE à la surface des cellules (Gangar et al., 2005).

Scribble. Scribble (Scrib) est une protéine présentant seize répétitions riches en Leucine (LRR) et quatre domaines PDZ (Bilder et Perrimon, 2000). Scrib est fortement impliquée dans la polarité apico-basale en excluant Crumbs du domaine baso-latéral. C'est aussi un marqueur précoce du site de formation des jonctions septées (Bilder et Perrimon, 2000).

Les deux complexes des jonctions septées (complexe stable et complexe de polarité) ont des rôles différents et malgré leur localisation identique, il n'existe à ce jour aucune évidence sur une possible interaction entre eux. Une grande différence entre ces deux complexes réside dans leur dynamique. En effet lors des expériences de recouvrement de fluorescence réalisées par Oshima et Fehon, il a été mis en évidence que les protéines du complexe stable ont une dynamique de recouvrement lente, de l'ordre de 30 minutes à 1 heure. Les composants du complexe de polarité, et notamment Dlg, présentent quant à eux une dynamique beaucoup plus rapide, de l'ordre de la minute. Le complexe de polarité est impliqué dans l'établissement de la polarité apico-basale (Bilder et Perrimon, 2000 ; Bilder et al., 2003 ; Tanentzapf et Tepass, 2003) quant au complexe stable, il jouerait un rôle plus tardivement dans le maintien de cette polarité (Laprise et al., 2009).

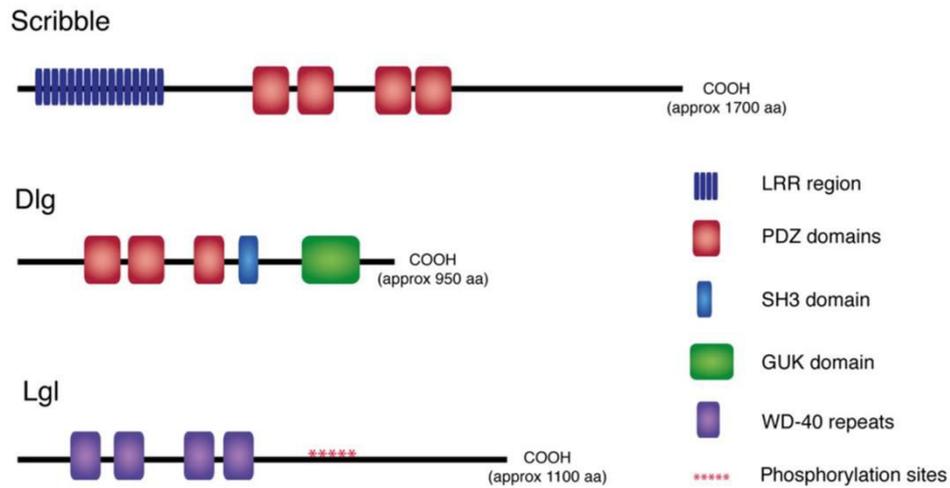


Figure K : Composition moléculaire des protéines du complexe de polarité Scribble. Le complexe de polarité Scrib, localisé au niveau des jonctions septées, est composé des protéines cytoplasmiques Scribble (Scrib), Discs large (Dlg) et Lethal giant larvae (Lgl). Ces protéines, très conservées au cours de l'évolution, jouent un rôle central dans l'établissement de la polarité apico-basale et la mise en place des jonctions septées. (Adapté de Elsum et al., 2012).

1.3.2 Les jonctions septées : structure

En microscopie électronique, les jonctions septées apparaissent sous la forme d'une échelle qui traversent l'espace intermembranaire (Lane et Swales, 1982 ; Tepass et Hartenstein, 1994). Les jonctions septées plissées s'organisent en de régulières lignes ondulées, parallèles au plan de l'épithélium. Au contraire, les jonctions septées lisses s'organisent en lignes parallèles régulièrement espacées (Lane et al., 1994).

1.3.3 Les jonctions septées : fonctions

L'une des fonctions des composants de jonctions septées est l'établissement et le maintien de la polarité apico-basale. Pour cela, le complexe de polarité Scribble est l'acteur majoritaire par son activité d'inhibition de protéines apicales (Bilder et Perrimon, 2000 ; Bilder et al., 2003 ; Tanentzapf et Tepass, 2003). Toutefois le complexe stable n'est pas exclu de cette fonction mais jouerait un rôle plus tardif dans le maintien de la polarité apico-basale (Laprise et al., 2009). Une fois mises en place, les jonctions septées sont une barrière de diffusion paracellulaire sélective entre le pôle apical et le pôle basolatéral des épithélia (Lamb et al., 1998 ; Skaer et al., 1987). Le rôle des jonctions septées comme plateformes de signalisation est peu décrit. Par exemple, Fas3 serait directement en lien avec la voie de signalisation JAK/STAT pour le contrôle de la morphologie des tissus (Wells et al., 2013).

1.3.4 Les jonctions septées : formation

La formation des jonctions septées est nécessaire pour la polarisation des cellules épithéliales et permet la démarcation entre les membranes apicales et basolatérales. La mutation de l'un des composants du complexe stable des jonctions septées entraîne un défaut de barrière de perméabilité et la mauvaise localisation des autres composants. Ils sont donc interdépendants quant à leur localisation et leur fonction. Si l'importance de différents composants de jonctions septées dans l'assemblage et le maintien de celles-ci est connue, la mise en

place du complexe stable n'est pas clairement établie. En revanche, la formation et la localisation des jonctions septées résultent directement de la mise en place de la polarité apico-basale (voir 1.5). Chez la Drosophile, plusieurs protéines Ly6, présentant un domaine GPI d'ancrage à la membrane (Hijazi et al., 2009 ; Syed et al., 2011), ont été proposé pour jouer un rôle dans la formation des jonctions septées en contribuant au trafic intracellulaire des composants de jonctions (Nilton et al., 2010). Toutefois, le rôle précis de ces protéines, adressage à la membrane ou recyclage par endocytose, n'est pas déterminé (Nilton et al., 2010). Très récemment, une étude a mis en évidence que l'une de ces protéines, Boudin (Bou), pouvait se retrouver dans le milieu extracellulaire et être internalisée et intégrée aux jonctions d'une cellule distante (Tempesta et al., 2017). Les auteurs montrent également qu'une autre protéine des jonctions septées est présente dans les vésicules internalisées, la protéine Kune. Cette dernière est endocytée pendant la morphogénèse des tissus épithéliaux. De manière intéressante, cette étude montre que Nrg joue un rôle central en empêchant l'internalisation de Bou et Kune (Tempesta et al., 2017).

1.4 Les jonctions tri-cellulaires

1.4.1 Dans le plan des jonctions adhérentes

A l'interface entre trois cellules, des jonctions particulières se forment pour maintenir le contact et l'intégrité du tissu : ce sont les jonctions tri-cellulaires (Figure B). Chez les vertébrés, il n'y a pour l'heure aucune protéine connue pour être spécifiquement enrichie aux jonctions tri-cellulaires dans le plan des jonctions adhérentes. Le complexe Cadherin/Catenin est présent aux jonctions tri-cellulaires mais il est localisé plus basalement par rapport aux jonctions bicellulaires (Yonemura, 2011). Toutefois, la nature des interactions, les protéines impliquées ou l'orientation des câbles d'actine aux niveaux des jonctions tri-cellulaires restent non définies. Finalement, l'existence d'une éventuelle interaction entre les jonctions tri-cellulaires des jonctions adhérentes

et des jonctions septées, pour une bonne organisation des points de contact à trois cellules, n'est pas déterminée. Chez les invertébrés, dans le plan des jonctions adhérentes, Sidekick (sdk) est décrit comme étant spécifiquement enrichi aux jonctions tri-cellulaires (Lye et al., 2014). Sdk est une protéine à un seul domaine transmembranaire dont la partie extracellulaire est composée de six domaines immunoglobuline (Ig) et treize domaines fibronectine. La courte partie intracellulaire présente un domaine PDZ (Nguyen et al, 1997). Sdk est impliqué dans des contacts homophiliques permettant l'adhésion entre cellules (Yamagata et al., 2002 ; Yamagata et Sanes, 2008), notamment par l'intermédiaire de ces quatre premiers domaines Ig présent en N-terminal (Goodman et al., 2016).

1.4.2 Dans le plan des jonctions serrées/septées

Dans le plan des jonctions serrées, chez les vertébrés, deux protéines sont particulièrement enrichies aux jonctions tri-cellulaires : Tricellulin et Angulin (Figure L). Première décrite, la tricellulin est une protéine de la famille Marvel fortement enrichie aux jonctions tri-cellulaire et très peu présente aux jonctions bicellulaires (Ikenouchi et al., 2005). Comme toutes les protéines de la famille Marvel, tricellulin présente quatre domaines transmembranaires. La seconde famille de protéines se compose de angulin-1 (ou LSR pour lipolysis-stimulated lipoprotein receptor), angulin-2 (ou ILDR pour Ig-like domain-containing receptor) et angulin-3 (ou ILDR2, LISCH-like ou C1orf32). Ce sont des protéines à un seul domaine transmembranaire (Masuda et al., 2011 ; Higashi et al., 2013) présentant dans leur partie extracellulaire un domaine Ig-like susceptible de jouer un rôle dans l'adhésion entre cellules. Ce dernier point n'a pas été testé directement concernant les angulins. Enfin, en absence de angulin-1, tricellulin est localisée uniformément aux jonctions bicellulaires. En revanche, l'absence de tricellulin n'affecte pas la localisation de angulin-1. Ainsi, angulin-1 permet le recrutement de tricellulin au niveau des jonctions tricellulaires, dans le plan des jonctions serrées (Masuda et al., 2011).

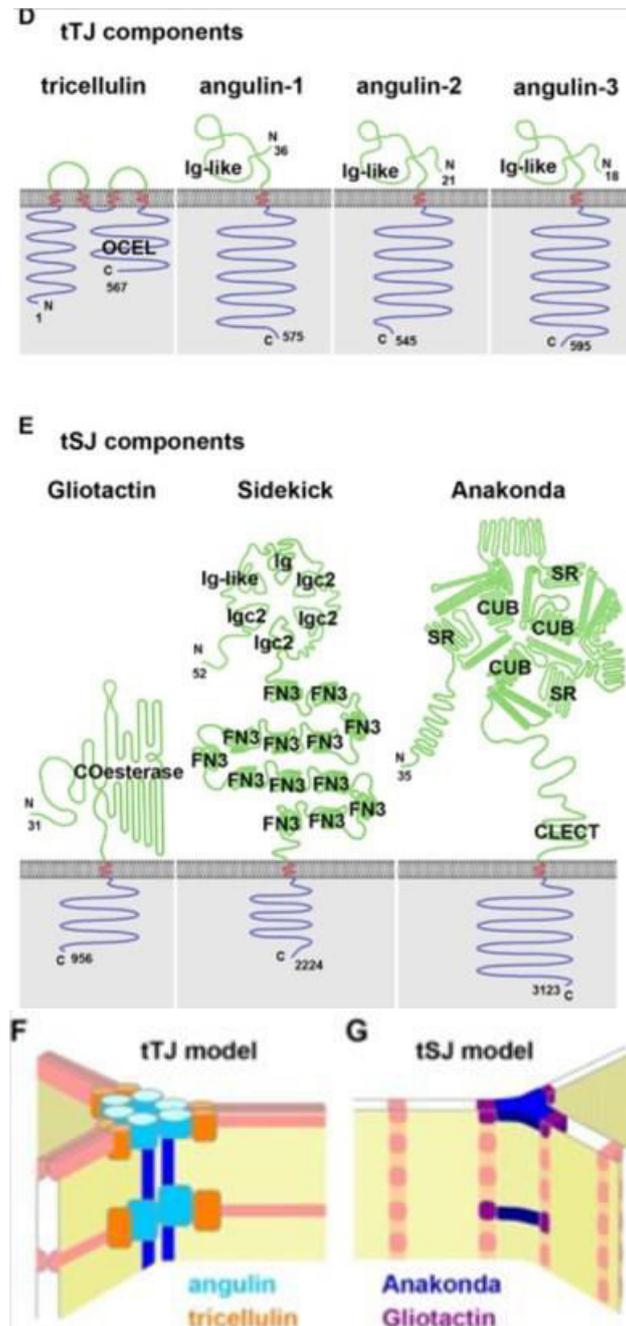


Figure L : Les jonctions tri-cellulaires au niveau des jonctions serrées et septées. La tricellulin (orange), une protéine de la famille Marvel à quatre domaines transmembranaires, est recruté aux jonctions serrées tri-cellulaires (tTJ) par Angulin (bleu clair), présentant un seul domaine transmembranaire. Aux jonctions septées tri-cellulaires (tSJ), c'est Bark beetle (Bark ou Anakonda, bleu foncé) qui recrute Gliotactin (violet). Ces deux protéines présentent un seul domaine transmembranaire. Enfin, Sidekick est une protéine transmembranaire localisée aux jonctions tri-cellulaires des jonctions adhérentes, chez la drosophile. (Adapté de Higashi et Miller, 2017).

Chez les invertébrés, Gliotactin (Gli) et Bark beetle (Bark, ou Anakonda (Aka)) sont deux protéines à un domaine transmembranaire spécifiquement enrichies au niveau des jonctions tri-cellulaires des jonctions septées. Gli est une protéine de type cholinestérase, sans activité enzymatique, et membre d'une famille de protéines d'adhésion, les électrotactines (Auld et al., 1995 ; Botti et al., 1998). Gli est nécessaire au développement et à la fonction des jonctions septées. Dans les premiers stades du développement embryonnaire, au moment de la formation des nouvelles jonctions entre cellules, Gli est localisée de manière uniforme à la membrane (stade 11). Puis, au fil de la maturation des jonctions septées, Gli va s'enrichir spécifiquement aux jonctions tri-cellulaires (stade 13) (Schulte et al., 2003). Sa localisation apico-basale évolue également : au stade 13, Gli est localisée sur toute la hauteur de la membrane latérale. Puis au stade 15, elle est restreinte à la partie apicale de cette membrane latérale. Ces observations font d'elle un composant des jonctions septées mais sa localisation spécifique aux jonctions tri-cellulaires laisse penser qu'elle joue un rôle différent des autres composants de jonctions septées. Schulte et al. ont montré une interdépendance entre Gli et NrX-IV quant à leur location respective. Enfin, en l'absence de Gli, la fonction de barrière de perméabilité paracellulaire est perdue malgré le maintien des jonctions. Les jonctions présentes en absence de Gli ne sont pas regroupées, ce qui leur confère une morphologie immature (Schulte et al., 2003). Plus récemment, Byri et al. ont mis en évidence que le recrutement de Bark aux jonctions tri-cellulaires était nécessaire et suffisant à celui de Gli (Byri et al., 2015). Bark présente dans sa partie extracellulaire trois domaines riches en cystéines (Scavenger Receptors (SR)), un domaine CUB (Complement/UEGF/BMP1), un domaine C-lectin et dix-neuf hélices β parallèles. Ces domaines sont organisés en trois structures répétées (Byri et al., 2015). Dans sa partie cytoplasmique, Bark présente un motif de liaison PDZ de classe 1, ETAM. Bark joue un rôle important dans la fonction de barrière de perméabilité, il est nécessaire à la formation des jonctions tri-cellulaires mais n'intervient pas dans l'assemblage des jonctions bicellulaires. En effet, dans un mutant *bark*,

Sinu, ATP α , Cora, Lac et Mtf présente une localisation normale. Seule Fas3 est mal localisée dans un mutant *bark* (Byri et al., 2015). Le recrutement de Bark aux jonctions tri-cellulaires est indépendant de la formation des jonctions bicellulaires. En effet, différents mutants présentant une absence de jonctions septées (*cora*, *Mcr*, *Nrg*, *sinu*), affichent une localisation normale de Bark (Byri et al., 2015).

1.4.3 Structure

Chez les vertébrés, aux niveaux des jonctions tri-cellulaires, les fibres de jonctions serrées, parallèles au plan de l'épithélium, s'étendent le long de l'axe apico-basal, formant un joint de jonctions bicellulaires autour de la jonction tri-cellulaire (Figure M). Cette organisation est appelée élément central d'étanchéité et les trois extensions de jonctions septées forment un canal étroit de 10 nm à chaque jonction tri-cellulaire (Staehelin, 1973). Chez les invertébrés, à l'approche d'un contact entre trois cellules, la configuration des jonctions septées change (Figure B). L'organisation en lignes parallèles au plan de l'épithélium est perdue et les lignes de jonctions septées tournent de 90 degrés, formant trois réseaux parallèles entourant la jonction entre trois cellules, ressemblant à l'élément central d'étanchéité décrit chez les vertébrés (Noirot-Thimotée et al., 1982). A l'intérieur du canal ainsi formé, et perpendiculaire à l'espace entre les trois cellules, sont décrits des séries de diaphragmes qui apparaissent liés non seulement aux trois réseaux de jonctions bicellulaires mais aussi à la membrane des trois cellules impliquées dans la jonction, formant ainsi de vrais contacts tri-cellulaires (Fristrom, 1982 ; Graf et al., 1982 ; Noirot-Thimotée et al., 1982).

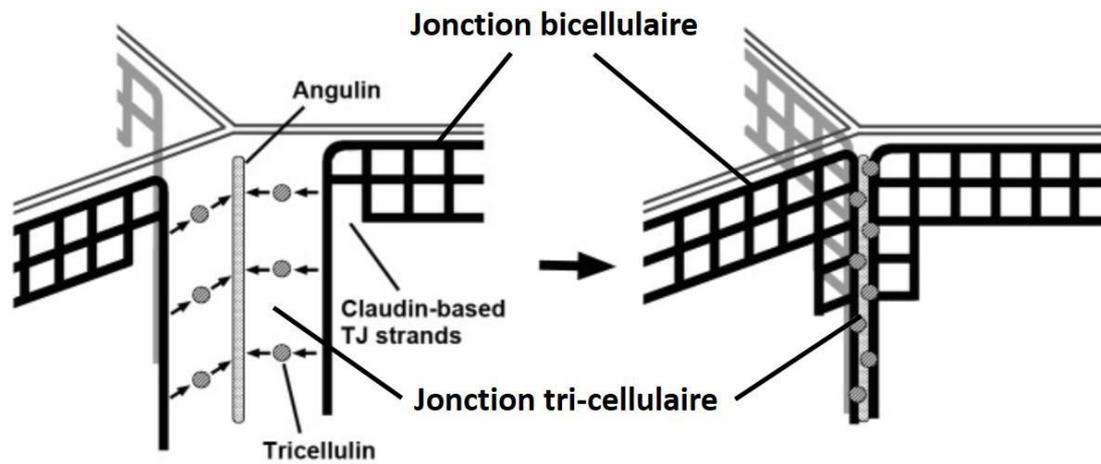


Figure M : Modèle structural des jonctions serrées tri-cellulaires. A l'approche d'une jonction tri-cellulaire, les fibres de jonctions bicellulaires s'étendent le long de l'axe apico-basal, formant un joint de jonctions bicellulaires, l'élément central d'étanchéité. (Adapté de Furuse et al., 2014).

1.4.4 Fonctions

Les jonctions tri-cellulaires assurent la cohésion entre les cellules au point de rencontre entre trois cellules. Elles jouent un rôle important dans la barrière de perméabilité. Dans l'embryon de *Drosophile*, l'absence de Bark entraîne l'apparition de trous dans le tissu épithélial, même si les jonctions bicellulaires sont détectables. Un phénomène similaire est observé en absence de Gli. L'absence de l'une ou l'autre de ces protéines entraîne donc la perte de la barrière de perméabilité paracellulaire est (Schulte et al., 2003 ; Byri et al., 2015). Outre leurs rôles dans la fonction de barrière des épithélia (Ikenouchi et al., 2005 ; Riazuddin et al., 2006 ; Krug et al., 2009 ; Furuse et al., 2014), les jonctions tri-cellulaires sont également impliquées dans l'organisation du cytosquelette (Oda et al., 2014) et sont un site préférentiel pour la migration trans-endothéliale des neutrophiles (Burns et al., 1997) et des cellules métastatiques (Nakai et al., 2005) et la propagation des pathogènes intracellulaires (Fukumatsu et al., 2012).

1.5 Etablissement et maintien de la polarité apico-basale

Depuis la fin des années 70s, la polarité épithéliale est étudiée chez les mammifères, établissant le rôle important du transport de vésicules et des interactions adhésives (Rodriguez-Boulan et al., 2005). Ce n'est que dans les années 80s que les organismes modèles, notamment *C. elegans* et *D. melanogaster*, vont permettre l'identification des protéines de polarité. Ainsi, trois complexes de polarité, conservés chez le ver, la mouche et les mammifères vont être mis en évidence (Knust et Bossinger, 2002 ; Tepass et al., 2001) : le complexe Crumbs (Crumbs-Pals1(Stardust)-Patj-Lin7) et le complexe Par (Par3(Bazooka)-Par6-aPKC) qui sont tous deux des complexes apicaux. Et le complexe Scrib (Lgl-Scrib-Dlg) qui lui est localisé le long de la membrane basolatérale (Figure K). L'identité des membranes apicale et basolatérale est maintenue par un antagonisme mutuel entre les différents complexes (Figure N)

(Bilder et al., 2003 ; Chartier et al., 2011 ; Laprise et al., 2009 ; Tanentzapf et Tepass, 2003). Au sein de ces complexes, les régulateurs de la polarité apicale sont notamment la protéine transmembranaire Crumbs (Crb), la protéine kinase C (aPKC), la petite GTPase Cdc42 et les protéines adaptatrices ou de soutien Bazooka (Baz chez la drosophile/Par3), Par6, Stardust (Sdt/PALS1/MPP5) et Patj (PATJ/MUPP1), la lipide phosphatase PTEN et les protéines à domaines FERM, Yurt et Moesin. Au sein même du complexe apical Par, Baz est phosphorylé par aPKC, l'excluant ainsi du domaine apical et lui conférant une localisation plus apico-latérale. Cette exclusion est spécifique des épithélia car elle requiert également une phosphorylation de Baz par Crumbs. En absence de ces phosphorylation, Baz recrute les jonctions adhérentes, menant à la perte du domaine apical et l'extension du domaine apico-latéral. L'exclusion apicale de Baz par Crumbs et aPKC permet de définir la limite apico-latérale (Morais-de-Sá et al., 2010). La régulation réciproque entre les régulateurs de polarité apicale et les régulateurs de polarité basolatérale est également basée sur des phosphorylations. Par1, un composant du domaine basolatéral, phosphoryle Baz/Par3, permettant ainsi la restriction du complexe Par au domaine apical (Benton et St Johnston, 2003). De plus, la phosphorylation de Baz/Par3 a pour conséquence d'empêcher sa liaison à aPKC et donc la formation du complexe Par (Benton et Johnston, 2003). Réciproquement, la phosphorylation et l'inactivation de Lgl et Par1 par aPKC restreint la localisation du complexe Scrib au domaine basolatéral (Betschinger et al., 2003 ; Yamanaka et al., 2003 ; Hurov et al, 2004, Kusakabe et Nishida, 2004 ; Suzuki et al., 2004). La fonction de Crumbs est quant à elle limitée au domaine apical par Lgl, Dlg et Scrib (Bilder et Perrimon, 2000 ; Bilder et al., 2003 ; Tanentzapf et Tepass, 2003). PTEN coopère avec Crumbs pour renforcer la polarité apicale (Chartier et al., 2011). Une fois la polarité apico-basale établie, le complexe Scrib n'est plus essentiel au maintien de la polarité. Ce sont les protéines du complexe stable, Yrt, Cora, NrX-IV, ATP α et Nrv2 qui vont contrecarrer les protéines de polarité apicale pour maintenir la polarité basolatérale (Laprise et al., 2009). Les mécanismes régissant

l'antagonisme mutuel entre ces deux groupes de protéines sont pour l'heure inconnus (Figure O).

Un contrôle précis de ces régulations est nécessaire au maintien de la polarité apico-basale mais également pour initier la morphogenèse épithéliale, comme par exemple lors de la gastrulation chez la drosophile (Wang et al., 2012).

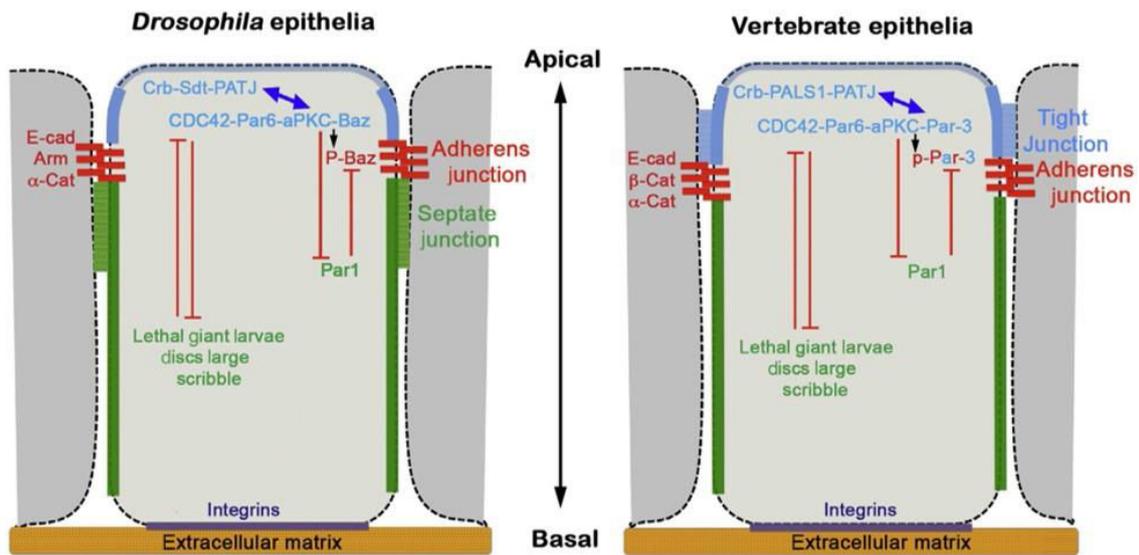


Figure N : Etablissement et maintien de la polarité apico-basale. Organisation subcellulaire basique des épithéliums de drosophiles et de vertébrés. Les domaines corticaux, établis le long de l'axe apico-basal, sont définis par l'activité de complexes de polarité conservés au cours de l'évolution. Les interactions positives (bleu) ou antagonistes (rouge) entre les principaux complexes de polarité sont représentées, tout comme les jonctions régulant l'adhésion entre cellules (jonctions adhérentes) ou la barrière de diffusion paracellulaire (jonctions septées ou serrées). (Adapté de Thieleke et al., 2017).

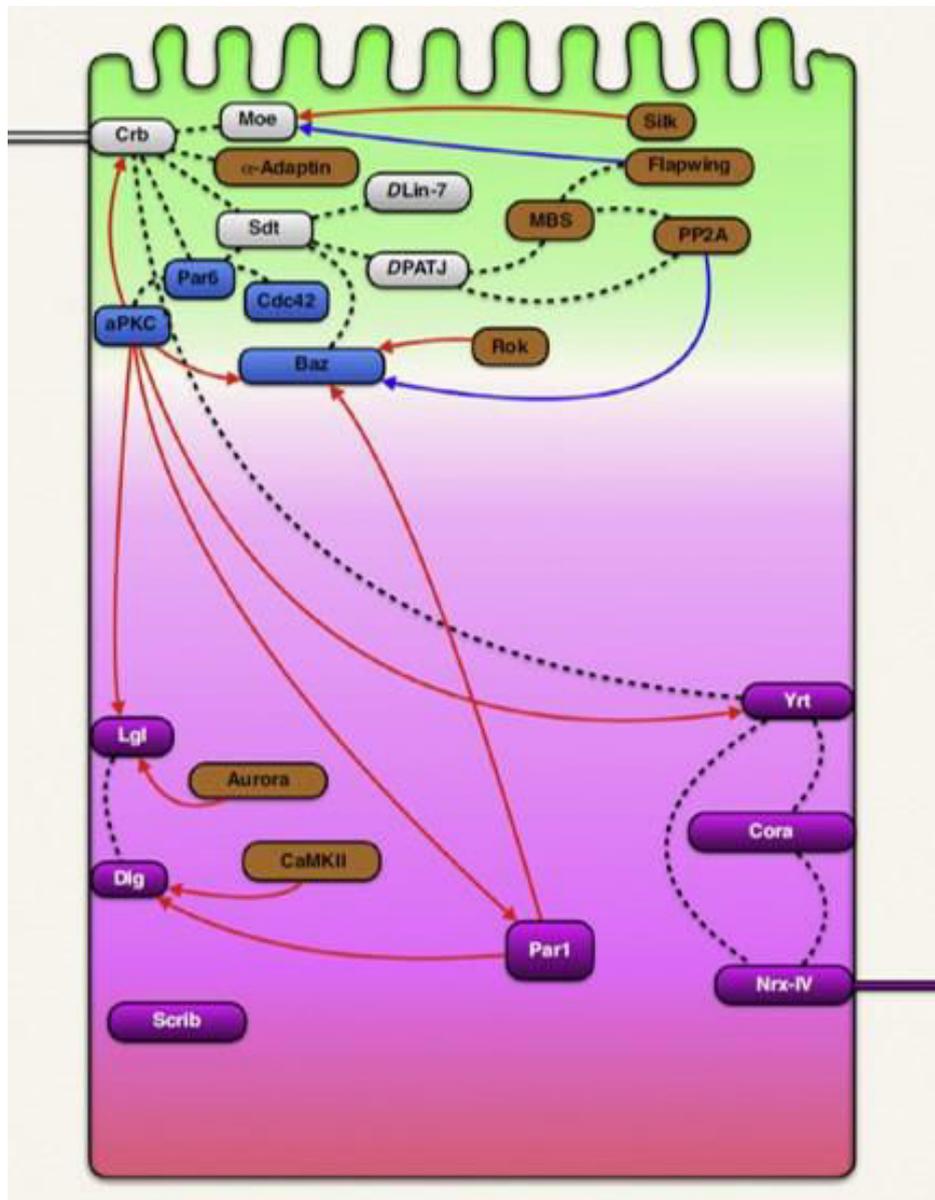


Figure O : Régulation de la polarité apico-basale chez *Drosophila*. Localisation des complexes majeurs de polarité et leurs interactions. Les phosphorylations sont indiquées par les flèches rouges, les déphosphorylations par les flèches bleues et les interactions par les lignes pointillées. Une fois la polarité établie par les complexes Crumbs (blanc), Par (bleu) et Scrib (mauve), le maintien de la polarité fait intervenir des protéines du complexe stable des jonctions septées, telles que Yurt (Yrt), Coracle (Cora) et Neurexin-IV (Nrx-IV). (Adapté de Flores-Benitez et Knust, 2016).

2- La cytotodiérèse.

2.1 Description

En fin de mitose, une fois le matériel génétique dupliqué, les deux futures cellules vont devoir se séparer physiquement : c'est la cytotodiérèse, la dernière étape de la division cellulaire (Figure P). La cytotodiérèse consiste en effet en la formation d'une nouvelle membrane entre les cellules filles. Pour cela, un sillon de division se forme de part et d'autre de la cellule et un anneau contractile est mis en place. Sa contraction permet la séparation du cytoplasme et des pronuclei issus de la mitose. On comprend alors aisément que le positionnement du sillon de division, déterminant lui-même l'emplacement de l'anneau contractile, est primordial à la bonne ségrégation du matériel génétique entre les cellules sœurs. Ces mécanismes sont donc hautement régulés et sont particulièrement bien décrits lors de la division de cellules isolés.

Dans le règne animal, la cytotodiérèse est initiée durant l'anaphase, lorsque l'activité de CDK1 diminue (Wheatley et al., 1997). Ceci entraîne la stabilisation des microtubules et la réorganisation du fuseau mitotique. Cycle cellulaire et cytotodiérèse sont donc intimement liés.

2.2 Le fuseau central

La réorganisation du fuseau mitotique mène à la formation du fuseau central (Figure Q). Le fuseau central est une zone dense en microtubules antiparallèles où vont venir s'accumuler de nombreuses protéines telles que des protéines associées aux microtubules (MAP), des protéines motrices ou encore des protéines kinases (Glotzer, 2009). Au niveau du fuseau central, les microtubules sont organisés grâce à l'intervention de protéines de cohésion qui reconnaissent leur extrémité positive. Parmi ces protéines, PRC1 (protein required for cytokinesis 1 ; Fascetto chez la drosophile) permet la formation de réseau de microtubules antiparallèles (Subramanian et al., 2010). De manière intéressante,

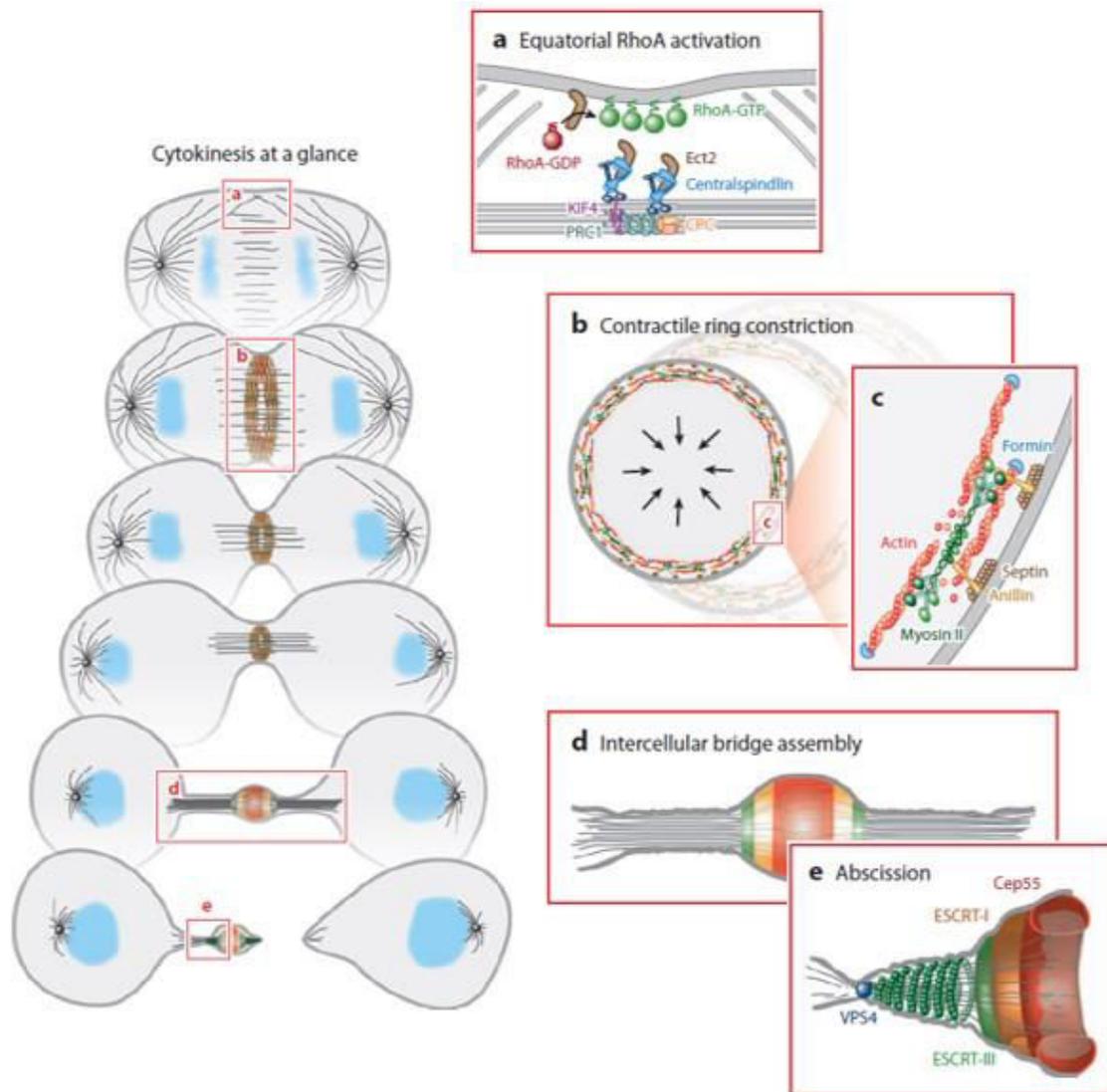


Figure P : Les différents évènements de la cytotdièrèse. (a) La cytotdièrèse débute par un signal entre le fuseau mitotique et le cortex de la cellule afin de déterminer une zone équatoriale riche en RhoA active où va se former le fuseau central. (b) La forme RhoA active permet l'assemblage de l'anneau contractile, composé d'un réseau de filaments d'actine, de myosine, de septines et d'anilline. (c) Lorsque l'anneau se contracte, la zone centrale du fuseau mature pour donner naissance au midbody. (d) Au cours de l'abscission, les filaments d'ESCRT-III permettent la scission de la membrane de part et d'autre du midbody pour générer les deux cellules filles. (Adapté de Green et al., 2012).

PRC1 est inhibée jusqu'au début de l'anaphase par CDK1, qui par phosphorylation va empêcher la dimérisation de PRC1 (Zhu et al., 2006). D'autres composants essentiels sont MKLP1 (Pavarotti chez la drosophile) et CYK-4 qui forment le complexe tétramérique centralspindlin. Centralspindlin voyage le long des microtubules pour atteindre leur extrémité positive et s'accumuler au sein du fuseau central (Hutterer et al., 2009). Là encore, CDK1 intervient pour réguler négativement l'affinité de MKLP1 pour les microtubules, en phosphorylant le domaine moteur de MKLP1 (Mishima et al., 2004). D'autres phosphorylations de MKLP1 durant l'anaphase, cette fois par Aurora B, sont nécessaires à l'achèvement de la cytotéièrese mais non nécessaire à l'assemblage du fuseau central (Guse et al., 2005). Aurora B est un composant du CPC (Chromosomal Passenger Complex) qui comprend également INCENP, Survivin et Borealin et est essentiel à l'assemblage du fuseau central. Le recrutement du CPC au fuseau central est, entre autres, permis par la suppression d'une phosphorylation médiée par CDK1 sur INCENP (Hummer et Mayer, 2009). Au niveau du fuseau central, le CPC joue un rôle important dans la phospho-régulation d'autres composants tels que PRC1 et MKLP1 (Ban et al., 2004 ; Guse et al., 2005), dans la cohésion des microtubules (Glotzer, 2009) mais il contribue aussi directement à l'assemblage de l'anneau contractile tout comme le complexe centralspindlin (Lewellyn et al., 2011).

2.3 Formation du sillon de division

Selon les organismes et les types cellulaires, deux mécanismes redondants vont plus ou moins contribuer au choix du site d'ingression de la membrane. L'un des mécanismes est basé sur la capacité des microtubules astraux à entrer en contact dynamique avec le cortex, inhibant ainsi l'ingression de celui-ci. Ainsi, une faible densité de microtubules dynamiques au cortex central de la cellule permettrait l'ingression de la membrane (Dechant et Glotzer, 2003). Le second mécanisme est basé sur l'accumulation au niveau du fuseau central de facteurs favorisant la contraction, notamment MKLP1 du complexe centralspindlin. La

majorité des microtubules astraux sont instables et MKLP1 n'a pas le temps d'atteindre le cortex de la cellule avant la dépolymérisation du microtubule auquel elle est attachée (Odell et Foe, 2008). Ainsi, centralspindlin est séquestré loin du cortex. Au contraire, au niveau du fuseau central, centralspindlin est accumulé grâce à la stabilisation des microtubules en anaphase (Figure Q). Centralspindlin participe alors à l'accumulation et l'activation de petites GTPases RhoA au niveau du cortex équatorial (Bement et al., 2005 ; Yuce et al., 2005 ; Nishimura et Yomenura, 2006). Ainsi, la contribution relative de ces deux mécanismes dépendrait notamment de la taille de la cellule. Il semblerait que dans les larges cellules, tel que l'embryon, le positionnement du sillon de division repose majoritairement sur la signalisation *via* les microtubules astraux. Dans les cellules de petites tailles, c'est majoritairement le positionnement du fuseau central qui serait responsable de l'emplacement du sillon de division (Balasubramanian et al., 2012).

Central spindle formation and signaling

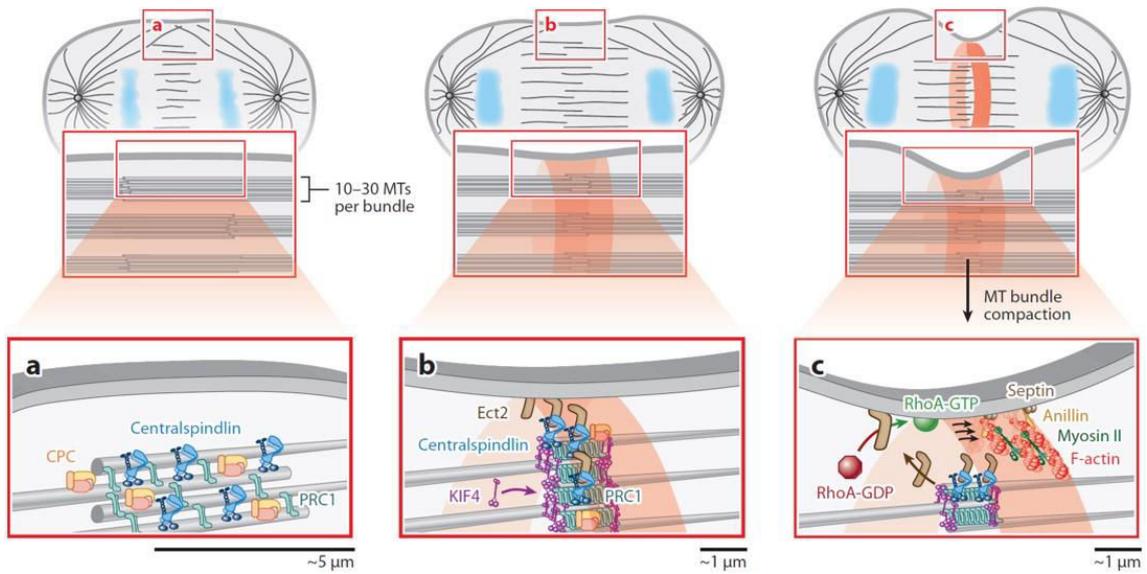


Figure Q : Assemblage du fuseau central et détermination du sillon de division. (a) En début d'anaphase, PRC1, Centralspindlin et le CPC (Chromosomal Passenger Complex) sont recrutés dans la zone centrale du fuseau mitotique, où ils favorisent le regroupement et le chevauchement des microtubules de polarité opposée qui proviennent des deux pôles du fuseau. (b) En milieu d'anaphase, KIF4 est recrutée dans la zone de chevauchement par PRC1. KIF4 arrête la croissance des microtubules en se positionnant sur leur extrémité positive, limitant ainsi l'épaisseur de la zone de chevauchement. Ect2 se lie à centralspindlin et est positionné sur la membrane équatoriale. (c) Ect2 contribue à la conversion de RhoA-GDP en RhoA-GTP pour promouvoir l'assemblage de l'anneau contractile. (Adapté de de Green et al., 2012).

2.4 Structure et dynamique de l'anneau contractile

2.4.1 Assemblage

La voie de signalisation impliquant RhoA est à l'origine de l'assemblage de l'anneau contractile par deux effecteurs majeurs : Diaphanous et ROCK. L'activation de Diaphanous (protéine de type formin) permet la nucléation des filaments d'Actine (Watanabe et al., 2008). La kinase ROCK phosphoryle Myosin II (MyoII) permettant ainsi son activation et phosphoryle également MYPT, une phosphatase responsable de l'inactivation de MyoII (Matsumura, 2005). MyoII est accumulée sous forme de points corticaux, indépendamment de l'Actine. De la même manière, la nucléation de l'actine est indépendante de MyoII. Enfin, MyoII appliquerait des forces sur les filaments d'actine pour assembler l'anneau.

2.4.2 Structure

L'anneau contractile est formé d'une fine couche de filaments protéiques formant un réseau sous la membrane plasmique au niveau du plan équatorial de la cellule (Schroeder, 1990). Outre MyoII et Actine, l'anneau contractile est également composé de Septins et d'Anillin (Figure P). Les septins forment des filaments associés à la membrane qui lient et sont recrutés par Anillin, qui est capable de se lier également à MyoII et Actine. L'anillin n'est pas impliquée dans l'assemblage de l'anneau contractile mais est un élément central de sa cohésion (D'Avino, 2009 ; Piekny et Maddox, 2010). Enfin, l'anneau contractile comprend également des protéines régulant la nucléation, la polymérisation et le désassemblage de l'Actine (Eggert et al., 2006 ; Wu et Pollard, 2005).

2.4.3 Dynamique

Les mécanismes et les forces impliqués dans la fermeture de l'anneau sont encore peu connus. De manière intéressante, dans l'embryon de *C. elegans*, la vitesse de fermeture de l'anneau est proportionnelle à la taille initiale de celui-ci et donc à la taille de la cellule (Carvalho et al., 2009). Du fait de la présence de

filaments d'actine et de myosin antiparallèles (Figure R), de nombreuses théories envisageaient un mécanisme similaire à la contraction des sarcomères dans les muscles. Toutefois, l'organisation au sein de l'anneau contractile n'est pas aussi précise et ne permet pas la mise en place de ce mécanisme. En effet, les filaments d'actine notamment sont polarisés de manière aléatoire au sein de l'anneau contractile (Kamasaki et al., 2007). De plus, au moment de la fermeture de l'anneau, les filaments d'actine et de myosine se désassemblent en même temps qu'ils se contractent (Schroeder, 1968). Des expériences de recouvrement de fluorescence ont montré que l'anneau contractile est un réseau dense et très dynamique d'actine. En effet, la vitesse moyenne de renouvellement de l'actine est de moins de trente secondes dans les cellules épithéliales de rein de porc, LLC-PK1 (Murthy et Wadsworth, 2005).

Un récent modèle, proposé chez la levure, associe la dépolymérisation de l'actine et la présence de protéines de liaison aux extrémités des filaments pour expliquer la constriction de l'anneau. Dans ce modèle, une protéine de liaison entre deux filaments d'actine serait capable de se lier de nouveau à l'extrémité du filament d'actine au fur et à mesure que celui-ci est raccourci. (Mendes Pinto et al., 2012). Les mécanismes sous-jacents à la fermeture de l'anneau contractile et les forces impliquées sont toujours au cœur d'un débat ouvert entre plusieurs modèles (Mendes Pinto et al., 2013 ; Cheffings et al., 2016 pour revue).

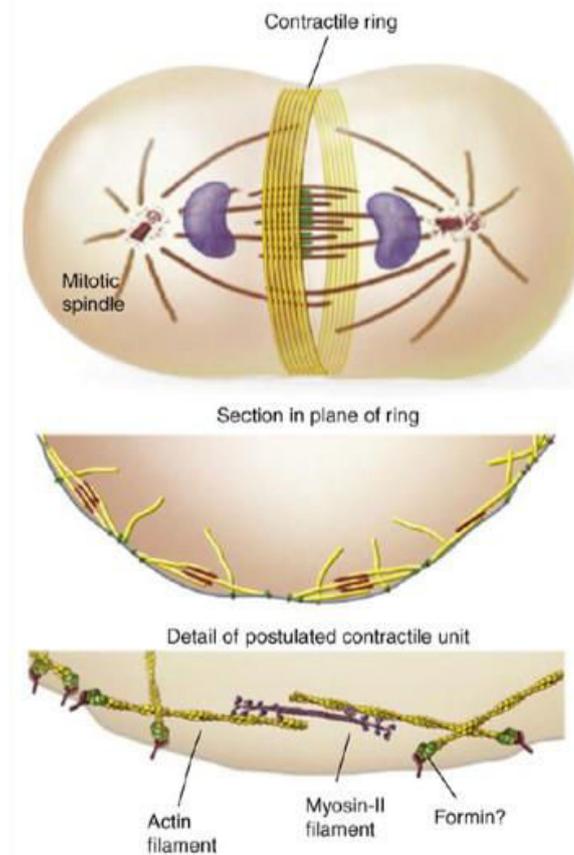


Figure R : Organisation simplifiée de l'anneau contractile. Les filaments d'actine et de myosine s'associent de manière antiparallèle au cortex de la membrane équatoriale. L'attachement de l'actine au cortex *via* les formines est hypothétique. En « marchant » le long d'un filament d'actine associé, la myosine applique des tensions sur la membrane plasmique. (Adapté de Pollard, 2010).

2.5 Contrôle de la cytodièrese et régulation de l'abscission

La constriction progressive de l'anneau contractile entraîne la compaction des microtubules du fuseau central et aboutit à la formation du pont intercellulaire, le midbody. Le midbody est une plateforme importante de recrutement et d'organisation de plusieurs protéines impliquées dans le contrôle et la régulation de la dernière étape de la cytodièrese, l'abscission. Cette étape permet la séparation physique des cellules sœurs.

2.5.1 Structure du midbody

Initialement décrit par Flemming en 1891, le midbody n'est décrit précisément que plus tard grâce à la microscopie électronique. En 1977, l'une des premières observations ultra-structurales du midbody montrent son organisation sous forme d'un cylindre de matériel dense aux électrons entourant un paquet de microtubules organisés parallèlement (Mullins et Biesele, 1977). Plus récemment, par cryo-tomographie électronique, Elad et al., ont mis en évidence deux populations de microtubules au sein du midbody : les microtubules dont l'extrémité se trouve dans le midbody et les microtubules traversant le midbody (Elad et al., 2011). Les nombreuses descriptions du midbody en microscopie électronique ou en microscopie à fluorescence ont mené à l'émergence de nombreux termes pour décrire les différentes régions du pont intercellulaire (Figure S). Le terme midbody est utilisé pour décrire toute la structure dense aux électrons comprenant la partie centrale du midbody, le corps de Flemming (Flemming body), ainsi que les deux régions de part et d'autre, les bras du midbody (midbody arms). En microscopie à fluorescence de cellules dont les microtubules sont marqués, le corps de Flemming apparaît comme une région noire non marquée. Cette absence de marquage ne reflète pas une absence de microtubules dans cette région mais la densité en protéines au niveau du corps de Flemming empêche l'accès des anticorps. Le corps de Flemming peut lui-même être décomposé en deux parties, le cœur du midbody et l'anneau du

midbody. Le cœur du midbody (midbody core) incluent les microtubules et les protéines associées au fuseau central, piégés au moment de la fermeture de l'anneau (Hu et al., 2012). L'anneau du midbody (midbody ring) résulte pour sa part de l'anneau contractile (Kechad et al., 2012).

Au niveau moléculaire, les protéines de l'anneau contractile, anillin et septins, ne sont pas essentielles à son ancrage à la membrane plasmique lors de sa fermeture. En revanche, elles deviennent essentielles pour maintenir la connexion entre de l'anneau du midbody et la membrane (Kechad et al., 2012). Une fois l'anneau complètement fermé, le diamètre du midbody est de l'ordre de 1 à 2 μm . A ce stade, il est aussi dépourvu d'Actine, les filaments d'acto-myosine étant dépolymérisés au fur et à mesure de la fermeture de l'anneau (Dambournet et al., 2011 ; Guizetti et al., 2011).

2.5.2 Abscission

Les cellules sœurs peuvent ainsi rester liées par le pont intercellulaire pendant plusieurs heures. Au cours de sa maturation, le pont intercellulaire va diminuer de taille, jusqu'à atteindre la moitié de sa taille initiale (Guizetti et al., 2011 ; Schiel et al., 2012). Environ 20 minutes avant l'abscission, le midbody va subir des modifications morphologiques (Figure T). En effet, de part et d'autre du midbody, on observe une zone de constriction qui contient des filaments associés à la membrane. Ces filaments de 17nm de diamètre, observés par la tomographie électronique de cellules ayant subies une congélation haute pression, forment une large hélice de chaque côté du pont intercellulaire (Guizetti et al., 2011). Les microtubules présents au sein du midbody sont compressés et sont rapidement dépolymérisés tandis que l'anneau se rétrécit. Lorsque que la constriction est complète de chaque côté du midbody, la séparation des cytoplasmes des deux cellules sœurs est effective. Dans les cellules humaines isolées, les débris du midbody (midbody remnant) se retrouvent alors libérés dans le milieu extracellulaire.

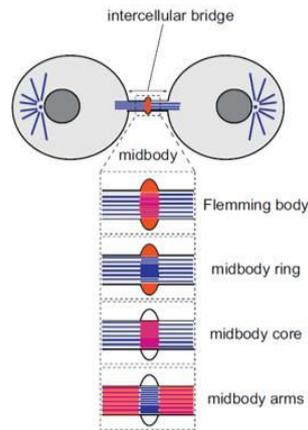


Figure S : Les différentes régions du midbody. Le corps de Flemming (Flemming body) constitue la partie centrale du midbody et peut, elle-même, être séparée en deux parties : l'anneau (ring) et le cœur (core) du midbody. Enfin de part et d'autre se trouvent les bras (arms) du midbody. (Adapté de D'Avino et Capalbo, 2016).

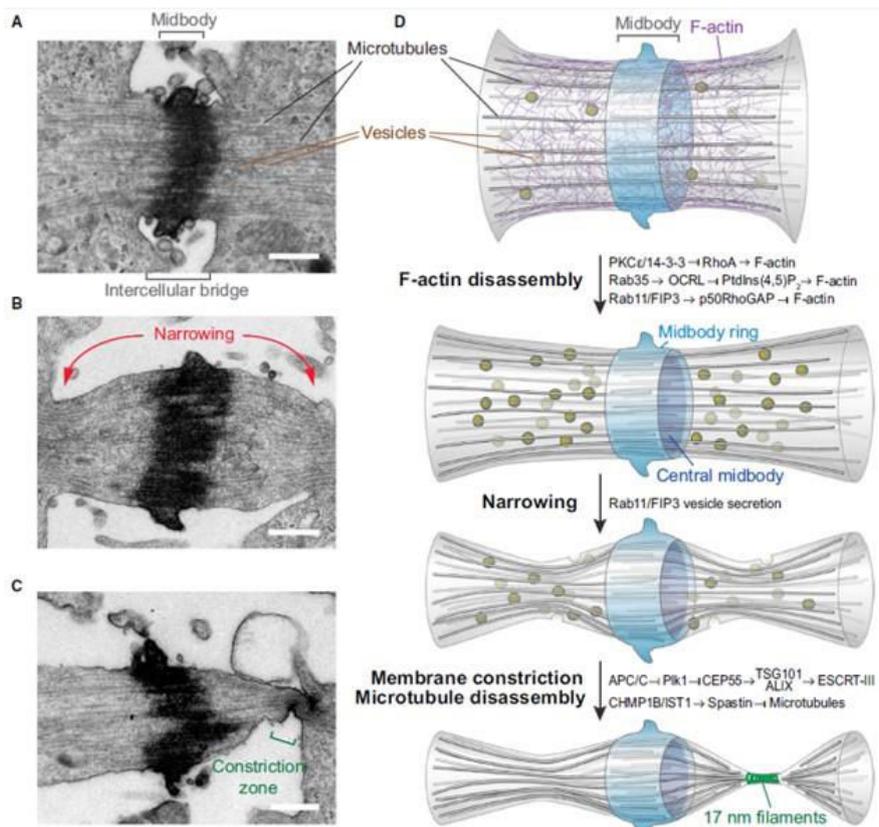


Figure T : Maturation du pont intercellulaire. (A-C) Images de microscopie électronique à différents stades de maturation du pont intercellulaire. (D) La fermeture complète de l'anneau est suivie du désassemblage de l'actin-F corticale. La fusion de vésicules coïncident avec l'amincissement progressif du pont de part et d'autre du midbody. L'abscission a lieu par l'assemblage et la constriction de filaments de 17nm à proximité du midbody. (Adapté de Mierzwa et Gerlich, 2014).

2.5.3 Recrutement des médiateurs de l'abscission

L'un des principaux effecteurs de l'abscission est ESCRT-III (Endosomal Sorting Complex Required for Transport III) qui est prédit pour être le composant majoritaire des filaments de 17nm formant une hélice de part et d'autre du midbody (Figure T). ESCRT-III est notamment connu pour favoriser la constriction et la fission des membranes plasmiques dans de nombreux processus tels que le bourgeonnement de vésicules ou de virus (McCullough et al., 2013). La déplétion de ESCRT-III inhibe la formation des filaments de 17nm et la constriction des membranes (Guizetti et al., 2011), ce qui laisse penser que si ce n'est pas ESCRT-III qui polymérise pour former les filaments, il régule directement leur assemblage. Le recrutement de ESCRT-III au site d'abscission nécessite l'intervention de différents facteurs. La protéine des centrosomes CEP-55 est recrutée au midbody en fin de cytotérièse grâce à sa liaison avec la protéine du complexe centralspindlin, MKLP1 (Lee et al., 2008 ; Morita et al., 2007). CEP-55 est régulé négativement par Plk1 (Polo like kinase 1), une protéine du fuseau central associée aux kinétochores (Bastos et Barr, 2010). CEP-55 recrute à son tour TSG101, composant du complexe ESCRT-I et ALIX, une protéine associée aux ESCRTs (Figure T et U) (Carlton et Martin-Serrano, 2007 ; Morita et al., 2007 ; Lee et al., 2008). Enfin, TSG101 et ALIX recrutent ESCRT-III. CEP-55 et TSG101 s'accumulent au niveau du corps de Flemming, tandis que la protéine du complexe ESCRT-III, CHMP4 (Snf7 / Shrub chez la drosophile), est recrutée dans deux zones de part et d'autre du midbody, au niveau des sites d'abscission (Elia et al., 2011).

Une autre voie de recrutement de ESCRT-III, impliquant plusieurs sous-unités du complexe PI(3)K-III (class III phosphatidylinositol-3-OH kinase), a été mise en évidence. Le produit catalytique de ce complexe, ptdIns(3)P (phosphatidylinositol-3-phosphate) est enrichi au niveau du midbody lors de la cytotérièse. Il y recrute la protéine des centrosomes FYVE-CENT et son

partenaire TIC19. Ce sont eux qui recrutent la sous-unité du complexe ESCRT-III, CHMP4B (Sagona et al., 2010).

Enfin, ESCRT-III recrute également Spastin, une enzyme impliquée dans la dépolymérisation des microtubules (Yang et al., 2008 ; Reid et al., 2005)

2.5.4 Régulation de l'abscission

L'abscission est une étape irréversible pour les cellules et il est important qu'elle soit régulée, notamment pour prévenir d'éventuels défauts de ségrégation chromosomique. Pour cela, un point de contrôle, très conservé au cours de l'évolution, est nécessaire et c'est l'un des rôles joué par le CPC (Chromosomal Passenger Complex) (Figure U). Comme décrit précédemment, le CPC est composé de Aurora B, INCENP (Inner Centromeric Protein), Survivin et Borealin (Carmena et al., 2012). Ces trois dernières protéines régulent notamment la localisation et l'activité kinase de Aurora B (Ruchaud et al., 2007). En présence de pont chromosomique entre les cellules sœurs, Aurora B phosphoryle MKLP1, maintenant ainsi l'intégrité du midbody (Steigemann et al., 2009). De plus, Aurora B régule directement l'abscission par son interaction avec le composant du complexe ESCRT-III, Snf7/Shrub/Vps32, chez l'homme et la drosophile. Dans les cellules humaines, Borealin interagit directement avec les trois protéines CHMP4 (A, B et C) pour les maintenir au contact du CPC. Ceci favorise la phosphorylation de CHMP4C par Aurora B (Capalbo et al., 2012 ; Carlton et al., 2012). L'inhibition de Aurora B au moment de l'abscission facilite la fission du pont intercellulaire. L'activité de Aurora B doit donc décroître pour permettre à l'abscission d'avoir lieu (Steigemann et al., 2009). Dans les cellules germinales de drosophiles, la fermeture de l'anneau contractile est incomplète et les cellules restent connectées entre elles, formant un syncytium de seize cellules contenues dans la chambre ovarienne. Dans ce contexte, la perte de fonction de AurB ou Svv entraîne la réduction du nombre de cellules par chambre ovarienne (Mathieu et al., 2013). Cette étude montre que Aurora B intervient dans la phosphorylation et l'inhibition de la Cycline B qui est localisée au niveau pont intercellulaire, où

elle favorise l'abscission. Cdk1 et Aurora B ont un effet opposé sur Cycline B, régulant ainsi le temps d'abscission dans les cellules humaines (Mathieu et al., 2013).

Enfin, une étude récente a testé la dynamique des composants du complexe ESCRT-III au niveau du midbody par des expériences de recouvrement de fluorescence. Ils ont ainsi mis en évidence que ESCRT-III formait un complexe extrêmement dynamique, renouvelé environ toutes les 20 secondes (Mierzwa et al., 2017). Ces mêmes auteurs montrent que le renouvellement rapide de ESCRT-III dépend de VPS4 (Vacuolar Protein Sorting 4). VPS4 est une ATPase initialement décrite comme étant requise au désassemblage des polymères d'ESCRT-III (Babst et al., 1998) et étant recrutée dans les derniers stades de l'abscission (Elia et al., 2011). Mierzwa et al. utilisent une protéine VPS4 fluorescente à un niveau endogène et montrent que VPS4 est en réalité recrutée dès les premières étapes de l'abscission, et simultanément à ESCRT-III. En absence de VPS4, ESCRT-III est stabilisé au niveau du midbody. VPS4 est donc nécessaire au renouvellement rapide de ESCRT-III au niveau du midbody (Mierzwa et al., 2017). Enfin, en analysant l'ultrastructure du pont intercellulaire en absence de VPS4, ces auteurs ont montré l'importance de VPS4 dans la formation des filaments de 17nm et surtout dans la constriction des membranes, nécessaire à la coupure physique.

De nombreuses questions restent à ce jour non résolues concernant l'abscission. Le fait que le midbody persiste de 80 minutes à plusieurs heures selon le type cellulaire pose la question des événements qui ont lieu durant cette longue période. Une équipe a montré que les tensions exercées au niveau du midbody pouvait retarder l'abscission d'environ trente minutes dans les cellules HeLa (Lafaurie-Janvore et al., 2013) mais les événements qui précèdent l'abscission sont encore inconnus. Enfin, une étude récente met en évidence que l'abscission pourrait être liée à l'entrée en mitose des cellules sœurs connectées par le pont

intercellulaire. En effet, les auteurs observent que l'abscission a lieu à un stade avancé en G1 dans les cellules HeLa et BALB/c3T3 (Gershony et al., 2014).

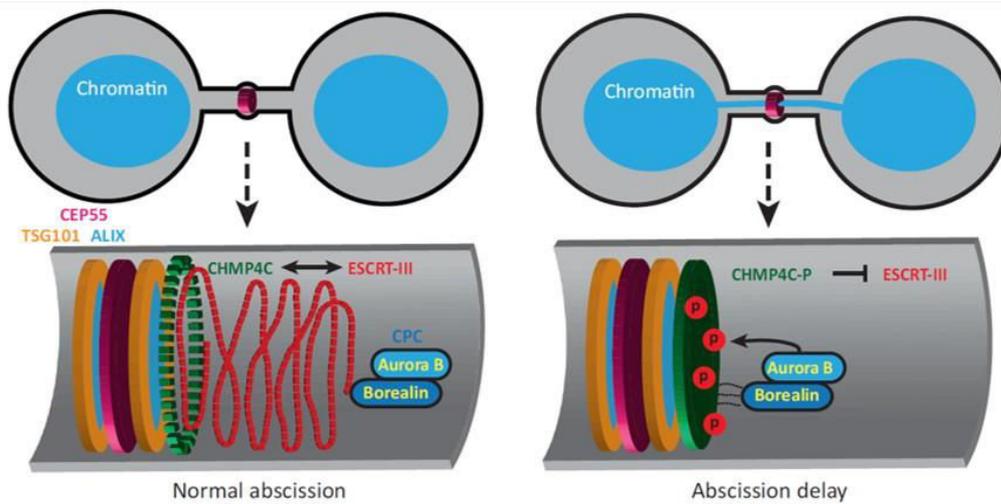


Figure U : La régulation de l'abscission par le CPC. Lorsque de la chromatine est piégée au sein du midbody (panneau de droite), CHMP4C (vert) se lie à Borealin (bleu foncé) et est phosphorylée par Aurora B (bleu clair), qui induit sa relocalisation au niveau du corps de Flemming et retarde l'abscission tant que la chromatine est présente. Lorsque les chromatides sœurs sont correctement séparées (gauche), CHAMP4C n'est plus inhibée et les filaments d'ESCRT-III (rouge) peuvent procéder à l'abscission. (Adapté de Agromayor et Martin-Serrano, 2013).

3- La machinerie ESCRT

La machinerie des ESCRT repose sur plusieurs complexes dont la découverte est intimement liée à la caractérisation des corps multi-vésiculaires (MVB) (Piper et Katzmann, 2007). Identifiés à l'origine chez les levures, les ESCRTs sont définies comme des protéines de tri dépendant de l'ubiquitine. Chez les levures, la fonction de ces protéines concerne le tri vacuolaire d'où le nom de nombre d'entre elles, Vps pour Vacuolar protein sorting. Parmi toutes ces protéines, celles appartenant à la classe E sont présentes au niveau de compartiments endosomaux (Raymond et al., 1992). Ces protéines vont ensuite être classées en différents complexes, les complexes ESCRT-0, -I, -II, -III et Vps4. Ces complexes sont tous nécessaires à la formation des corps vésiculaires et sont recrutés de manière séquentielle du cytoplasme vers les endosomes tardifs.

3.1 Les différents complexes ESCRT

Dans ce paragraphe, la description des complexes et de leur formation est basée sur la formation des corps multivésiculaires. Ces vésicules sont générées par l'invagination de la membrane des endosomes tardifs formant un bourgeonnement vers la lumière des organelles (Figure V). Les corps multivésiculaires libèrent par la suite leur contenu dans la lumière des lysosomes par fusion avec la membrane lysosomale. Les protéines qu'ils contenaient sont alors dégradées par des enzymes hydrolytique (Futter et al., 1996).

3.1.1 ESCRT-0

Le complexe ESCRT-0 (Figure W) est composé de deux sous-unités, HRS (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) et STAM1/2 (signal transducing adaptor molecule1/2). Chez la levure, ces deux sous-unités sont Vps27 et Hse1. Hrs et STAM1/2 interagissent *via* leur domaine hélicoïdal GAT dans un ratio d'un pour un (Prag et al., 2007). HRS présente un domaine à doigt de zinc FYVE (Fab-1, YGL023, Vps27, EEA1) permettant de lier PtdIns3P

(Phosphatidylinositol-3-phosphate). Cette caractéristique permet le recrutement de ESCRT-0 à la membrane et explique sa spécificité pour les endosomes (Raiborg et al., 2001). HRS et STAM1/2 sont capables de lier l'ubiquitine, ce qui favorise leur affinité pour les endosomes enrichis en protéines « cargo ». Ces deux types d'interaction permettent d'initier le recrutement des ESCRTs au niveau des endosomes.

3.1.2 ESCRT-I

Contrairement au complexe ESCRT-0, le complexe ESCRT-I n'interagit que très faiblement avec les membranes *via* des interactions électrostatiques. En réalité, le recrutement de ESCRT-I aux membranes est dépendant de son interaction avec ESCRT-0 à la fois chez la levure et chez les métazoaires (Bache et al., 2003 ; Katzmann et al., 2003 ; Lu et al., 2003). ESCRT-I (Figure W) est un complexe composé de Tsg101 (tumor susceptibility gene 101 ; Vps23 chez la levure), Vps28, Vps37, Mvb12 et UBAP1. L'interaction entre les complexes -0 et -I est la résultante de l'interaction entre le domaine UEV (Ubiquitin E2 variant) de Vps23/Tsg101 et le domaine PTAP-like de Vps27/Hrs (Katzmann et al., 2003 ; Kostelansky et al., 2006). Le complexe ESCRT-I forme un oligomère étiré d'environ 20nm de long qui interagit avec ESCRT-0 et ESCRT-II par ses extrémités opposées.

3.1.3 ESCRT-II

Le complexe ESCRT-II est un complexe hétéro-tétramérique en forme de Y (Figure W) composé de EAP30, EAP45 et EAP20, respectivement Vps 22, Vps36 et Vps25 chez la levure. EAP30/Vps22 et EAP45/Vps36 forment la base du Y et sont chacun lié à une copie de EAP20/Vps22 qui forme les bras du Y (Hierro et al., 2004 ; Teo et al., 2004). Le complexe ESCRT-II interagit avec ESCRT-I grâce à l'interaction entre le domaine GLUE (GRAM-ubiquitin-binding in EAP45) de EAP45/Vps36 et la partie C-terminale de Vps28 (Gill et al., 2007 ; Teo et al., 2006). Chez l'homme, l'interaction entre ESCRT-I et ESCRT-II est encore mal

caractérisée car le domaine GLUE est légèrement différent de celui de la levure, qui contient des séquences NZF (Npl4-type zinc finger). ESCRT-II est aussi capable, comme ESCRT-0, de se lier, avec une grande affinité, au PtdIns3P par son domaine GLUE (Slagsvold et al., 2005), ce qui lui confère une localisation spécifique aux endosomes. Enfin le lien entre ESCRT-II et ESCRT-III est bien défini : EAP20/Vps25 se lie à c du complexe ESCRT-III.

3.1.4 ESCRT-III

Contrairement aux précédents complexes ESCRT, ESCRT-III ne forme pas un complexe cytoplasmique stable. ESCRT-III est composé de quatre sous-unités (Figure W) : CHMP6, CHMP4, CHMP3 et CHMP2 (CHMP pour Charged multivesicular body protein) qui sont respectivement chez la levure Vps20, Snf7, Vps24 et Vps2. Les monomères de ESCRT-III ne localisent pas aux endosomes mais existent dans le cytoplasme sous une forme auto-inhibée dont le mécanisme n'est pas encore bien décrit. L'activation de ESCRT-III se produit quand la sous-unité EAP20/Vps25 de ESCRT-II interagit avec EAP20/Vps25, ce qui induit la formation et le recrutement du complexe ESCRT-III aux endosomes (Teo et al., 2004). Par la suite, EAP20/Vps25 recrute CHMP4/Snf7 qui sera coiffée par le recrutement de CHMP3/Vps24. CHMP4/Snf7 recrute également des adaptateurs du complexe ESCRT-III, Alix/Bro1 (apoptosis-linked gene-2 interacting protein X / BCK1-like resistance to osmotic shock protein 1) qui permet de stabiliser les filaments de CHMP4/Snf7 et de recruter l'enzyme de dé-ubiquitination Doa4 (degradation of alpha 4) (Luhtala et Odorizzi, 2004 ; Odorizzi et al., 2003). Chez l'homme, Alix qui est une protéine associée au complexe ESCRT-I interagit avec l'extrémité C-terminale de CHMP4 (McCullough et al., 2008). Une fois au niveau des endosomes, CHMP3/Vps24 recrute CHMP2/Vps2, terminant ainsi l'assemblage du complexe ESCRT-III.

3.1.5 Vps4

Une fois assemblé, le complexe ESCRT-III a besoin d'énergie pour se dissocier de la membrane. Cette énergie est apportée par Vps4 (SKD1 chez l'homme), une AAA (ATPase associated with various cellular activities) ATPase de classe 1 (Babst et al., 1998). Les monomères de Vps4 se multimérisent en dodecamères stables composés de deux anneaux hexamériques (Figure W). Ils forment un super-complexe avec LIP5/Vta1 qui permet l'activité ATPase de Vps4 (Babst et al., 1997, Scott et al., 2005 ; Yu et al., 2008). CHMP5/Vps60 est une unité « accessoire » du complexe ESCRT-III qui permet de faire la liaison entre ESCRT-III et le complexe Vps4. En effet, LIP5/Vta1 interagit directement avec CHMP5/Vps60 *via* deux domaines MIT (microtubule-interacting and trafficking) qui lie les domaines MIMs (MIT interacting motifs) des sous-unités du complexe ESCRT-III. LIP5/Vta1 joue donc le rôle d'adaptateur entre Vps4 et ESCRT-III (Azmi et al., 2008 ; Shiflett et al., 2004).

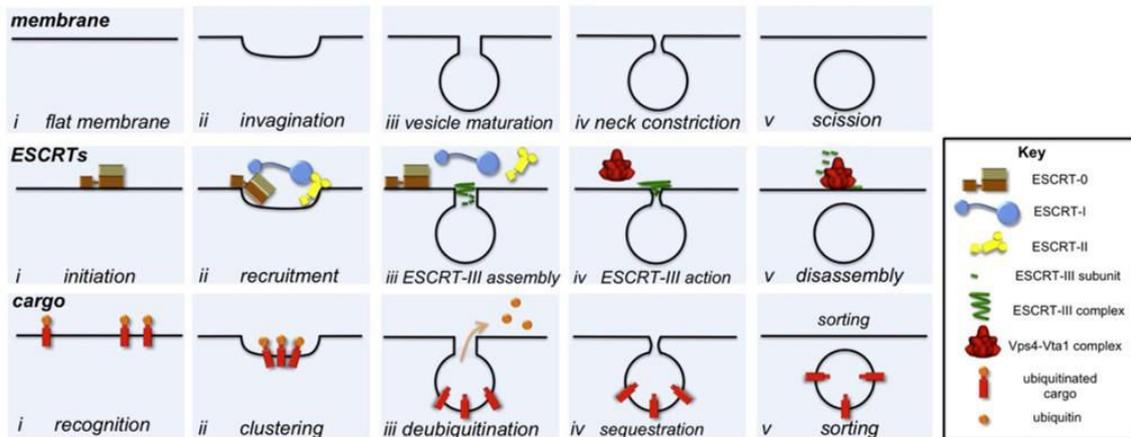


Figure V : Bourgeoisement des vésicules intraluminales. ESCRT-0 initie la courbure de la membrane en engageant des protéines Cargo ubiquitinées. Les complexes ESCRT-I et ESCRT-II se lient entre eux et aux protéines Cargo pour former une zone enrichie en ESCRT-Cargo. ESCRT-II permet la nucléation et l'assemblage du complexe ESCRT-III qui procède à la coupure du bourgeon de membrane et est désassemblé par le complexe Vps4. (Adapté de Henne et al., 2011).

Complexes	Structure
Yeast Human	
ESCRT-0	
Vps27 Hrs	
Hse1 STAM1/2	
ESCRT-I	
Vps23 Tsg101	
Vps28 hVps28	
Vps37 Vps37A,B,C	
Mvb12 hMvb12A,B	
ESCRT-II	
Vps36 EAP45	
Vps22 EAP30	
Vps25 EAP20	
ESCRT-III	
Vps20 CHMP6	
Snf7 CHMP4A,B,C	
Vps24 CHMP3	
Vps2 CHMP2A,B	
Vps4 Complex	
Vps4 SKD1	
Vps60 CHMP5	
Vta1 LIP5	

Figure W : Composition et structure des différents complexes ESCRT. (Adapté de Henne et al., 2011).

3.2 D'autres rôles des ESCRTs

3.2.1 Bourgeonnement de virus

Dans les années 90, Göttlinger et al. découvraient que la principale protéine structurale du virus HIV-1, Gag, présentait une petite séquence peptidique nécessaire au relargage du virus (Göttlinger et al., 1991). La délétion de cette séquence entraîne l'accumulation de virions à la surface membranaire des cellules, ce qui montre le rôle important de cette séquence dans la dernière étape de remodelage des membranes, nécessaire à la libération du virus. La séquence peptidique, retrouvée par la suite dans d'autres virus, est appelée L-domain (late budding domain). La petite taille et l'enrichissement en Proline de ce motif peptidique laissait penser à son implication dans le recrutement de protéines cellulaires. Plus tard, l'interaction de ces séquences peptidiques avec des composants des ESCRTs sera mise en évidence. Ainsi, le virus HIV-1 et Ebola recrute Tsg101 du complexe ESCRT-I (Martin-Serrano et al., 2003a), le virus EIAV (equine infectious anemia virus) recrute ALIX (Martin-Serrano et al., 2003b) et le virus RSV (Rous sarcoma virus) recrute des E3 ubiquitine ligase (Martin-Serrano et al., 2005 ; Kikonyogo et al., 2001). Certains virus comme Ebola présente plusieurs séquences peptidiques, leur permettant ainsi de lier différents composants des ESCRTs. Ebola est par exemple capable de recruter Tsg101 mais aussi certaines E3 ubiquitine ligases. L'implication des ESCRTs dans le relargage des virus répond au modèle suivant : dans un premier temps, le bourgeonnement viral se forme à la membrane de la cellule hôte grâce à l'assemblage de protéines virales et ne nécessite pas l'intervention des ESCRTs. Ensuite, un ou plusieurs domaines peptidiques des protéines virales comme Gag recrutent un ou plusieurs composants d'ESCRTs. Ainsi, le recrutement de Tsg101, ALIX ou des ubiquitines ligases permet d'initier la voie qui mène au recrutement de ESCRT-III au col reliant le virus à la cellule hôte. Une fois recruté, ESCRT-III promeut la constriction du col et ainsi la libération du virus. Enfin, Vps4 intervient pour désassembler et libérer les complexes ESCRT-III.

3.2.2 Réparation membranaire

Certains évènements, tels que le stress mécanique ou la présence d'agents biologiques comme les toxines, peuvent être à l'origine de dommage sur la membrane plasmique des cellules. Lorsque la membrane des cellules eucaryotes subit un dommage créant un trou dans la bicouche lipidique, les mécanismes mis en place par la cellule permettent la cicatrisation en quelques secondes. Depuis très longtemps, il a été mis en évidence que le mécanisme de réparation membranaire dépendait strictement de l'entrée soudaine de Ca^{2+} extracellulaire (Heilbrunn, 1956 ; Chambers et Chambers, 1961). Cette entrée de Ca^{2+} entraîne un processus d'exocytose nécessaire à la réparation (Miyake et McNeil, 1995 ; Bi et al., 1995). Plus récemment, Jimenez et al. ont mis en évidence un rôle des ESCRTs dans la réparation des membranes. En effet, après avoir provoqué un dommage à la membrane, ils observent le recrutement des protéines du complexes ESCRT-III, CHMP4B mais également CHMP3, CHMP2A et CHMP2B. Seul CHMP6 n'est pas recruté. Concernant les autres complexes ESCRT, HRS (ESCRT-0) n'est pas détecté et Tsg-101 (ESCRT-I) quant à lui est observé au niveau du dommage à la membrane. De manière intéressante, ALIX qui est capable de recruter directement ESCRT-III en contournant ESCRT-O, -I et -II, est recrutée et co-localise avec CHMP4B. Le recrutement des ESCRTs est indépendant du transport vésiculaire car il était toujours effectif en absence de microtubules, ce qui suggère un recrutement des ESCRTs directement à l'endroit où le trou est formé dans la membrane plasmique. Les auteurs ont montré que le recrutement précoce de ESCRT-III est favorisé par l'entrée de Ca^{2+} extracellulaire. En effet, en absence de Ca^{2+} le recrutement des ESCRTs est fortement inhibé et la cellule entre en nécrose. De même, une mutation du domaine de liaison au Ca^{2+} de la protéine ALIX compromet son recrutement à la membrane endommagée. Enfin, Vps4 est également recrutée rapidement au site de dommage à la membrane et dès que la cicatrisation est complète, ESCRT-III est dissocié de la zone de dommage. ESCRT-III joue donc un rôle central dans

la réparation des membranes dans le but de préserver l'homéostasie et la survie cellulaires (Jimenez et al., 2014).

3.2.3 Cytodiérèse et abscission

Lors de la cytotiérèse, les ESCRTs sont recrutées au niveau du midbody. Ce recrutement nécessite CEP55 qui interagit avec Tsg-101 et ALIX (Carlton et Martin-Serrano, 2007 ; Morita et al., 2007). Tout comme pour le mécanisme de réparation membranaire, l'ensemble des complexes ESCRT n'est pas impliqué. En effet, ESCRT-III est directement recruté par Tsg101 et ALIX (voir 2.5.3). De manière surprenante, les homologues de CHMP4 et Vps4 ont été identifiés comme étant impliqués dans la division cellulaire chez les Archées pourtant dépourvues de système endosomal (Samson et al., 2008 ; Lindas et al., 2008). Ceci suggère un rôle ancestral des ESCRT dans l'abscission. Dans les cellules HeLa, l'abscission nécessite la maturation du midbody et son affinement, passant d'un diamètre de 1.5 à 2 μ m à un diamètre d'environ 100nm. Cette constriction a lieu de part et d'autre du midbody environ 10 à 20 minutes avant l'abscission et constitue le site d'abscission (Guizetti et al., 2011 ; Elia et al., 2011). Ces mêmes études ont montré que les protéines ESCRTs étaient recrutées au midbody juste avant l'abscission. Plusieurs modèles sont proposés pour expliquer les raisons de la constriction des membranes de part et d'autre du midbody (Figure X) (Guizetti et Gerlich, 2012). Le premier modèle propose que la polymérisation des ESCRT-III serait, elle-même, le moteur de la constriction membranaire. Le second modèle propose que les ESCRT ne seraient impliquées que dans la stabilisation d'une déformation de membrane. Enfin, un modèle propose que le remodelage des filaments de ESCRT-III par Vps4 entraînerait la constriction des membranes. Ce dernier modèle semble être confirmé par une étude récente montrant le rôle primordial de Vps4 dans la constriction des membranes (Mierzwa et al., 2017), menant à la coupure physique entre les cellules sœurs (voir 2.5.4).

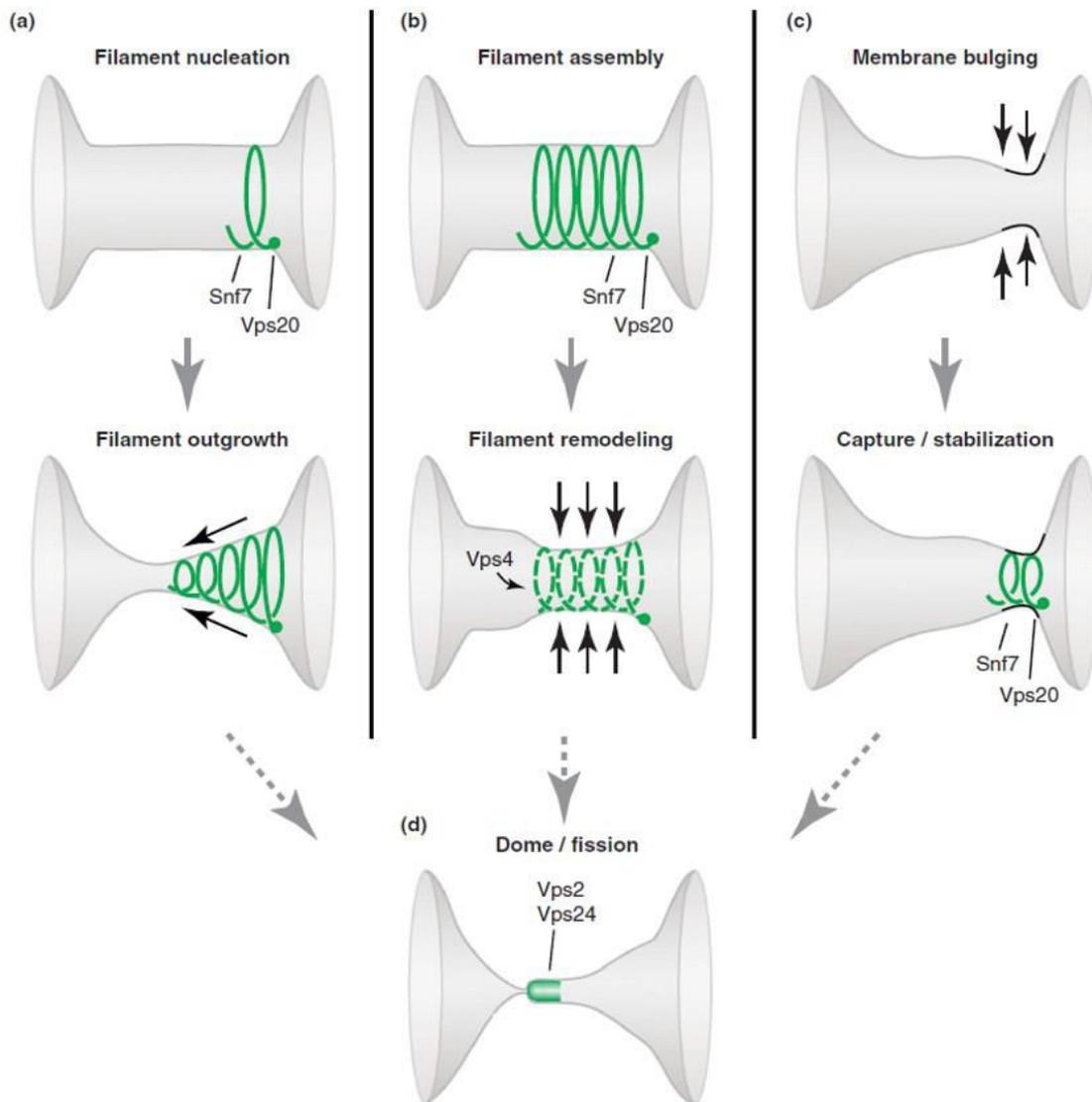


Figure X : Trois modèles expliquant la constriction des membranes par les filaments de ESCRT-III. (a) Au cours de la nucléation des filaments de ESCRT-III, ceux-ci se courbent vers l'intérieur et réduisent ainsi progressivement le diamètre du pont intercellulaire. (b) Les filaments d'ESCRT-III se forment dans le pont, leur désassemblage par Vps4 entraîne la constriction des membranes. (c) La formation de domaines lipidiques dans le pont favorise la déformation de la membrane, qui est reconnue et stabilisée par les filaments d'ESCRT-III. (d) Une fois que le pont a atteint un diamètre de 50nm, Vps2 et Vps24 viennent stabiliser la structure et rapprocher les membranes pour permettre la fission membranaire. (Adapté de Guizetti et Gerlich, 2012).

4- La cytotodiérèse des cellules épithéliales

La cytotodiérèse des cellules épithéliales est différente de celle des cellules isolées de par les caractéristiques inhérentes au tissu. En effet, plusieurs facteurs entrent en jeu tels que les contacts étroits avec les cellules voisines, la polarité apico-basale ou encore la fonction de barrière du tissu qui doivent être transmis et/ou maintenus pour préserver l'intégrité de l'épithélium.

4.1 Orientation de la division

Pour permettre la croissance de l'épithélium et le maintien de son organisation, l'orientation de la division des cellules est hautement régulée. En ce qui concerne les épithélia monocouche, la division est parallèle au plan de l'épithélium, c'est-à-dire que le fuseau central, quant à lui, s'assemble perpendiculairement au plan du tissu. Dans la suite de ce chapitre, nous nous intéresserons particulièrement aux divisions dans le plan de l'épithélium au cours desquelles l'anneau coupe l'ensemble des jonctions, adhérentes et serrées ou septées. La bonne orientation du fuseau mitotique dépend des forces mécaniques générées par le cytosquelette et des signaux corticaux.

4.1.1 Le cytosquelette

Dans les épithélia colonnaires et pseudostratifié, au moment de la mitose, la cellule s'arrondie tout en étant restreinte au domaine le plus apical de l'épithélium. Pour cela, le noyau, qui en interphase est localisé dans la partie basale de la cellule, acquiert une position apicale. Ce déplacement du noyau est guidé par des contractions corticales dépendantes du réseau d'actomyosine (Norden et al., 2009 ; Leung e al., 2011 ; Meyer et al., 2011). Toutefois, le mécanisme à l'origine des contractions orientées d'actomyosine du pôle basal vers le pôle apical est peu connu. L'une des hypothèses est basée sur la localisation polarisée de Myosin II le long de l'axe apico-basal. Dans une situation sauvage, Myosin II est enrichie au pôle apical des cellules. Une situation mutante,

dans laquelle la localisation de Myosin II est affectée, donne lieu à une mauvaise localisation du noyau au moment de la division, entraînant ainsi une complète désorganisation du tissu épithélial (Rujano et al., 2013).

4.1.2 Les signaux corticaux

Le fuseau mitotique est ancré au cortex, de part et d'autre de la cellule, par l'intermédiaire des microtubules astraux (Théry et Bornens, 2006). L'orientation du fuseau dans le plan de l'épithélium nécessite des forces de tractions appliquées aux centrosomes *via* des moteurs protéiques, dynein-dynactin, qui se déplace vers l'extrémité moins des microtubules astraux (Kotak et al., 2012). Les complexes dynein-dynactin sont restreints à certains endroits du cortex cellulaire par des signaux moléculaires. Cette restriction permet de définir l'orientation de la division. LGN (Pins chez la drosophile) est un des facteurs impliqués dans cette fonction. Il est localisé au cortex latéral en liant Gai, elle-même liée à la membrane. LGN recrute NuMa (Mud chez la drosophile) qui lie directement le complexe dynein-dynactin (Wang et Zheng, 2011 ; Peyre et al., 2011).

Dans les disques imaginaux d'ailes de drosophile, l'ancrage du fuseau mitotique au cortex a lieu au niveau des jonctions septées, juste sous les jonctions adhérentes. L'un des composants de jonctions septées joue un rôle central dans l'orientation du fuseau mitotique. Il s'agit de Dlg qui interagit directement avec LGN. Une mauvaise localisation de Dlg dans une situation mutante entraîne une désorganisation du tissu épithélial générée par des orientations aléatoires du fuseau mitotique des cellules se divisant (Nakajima et al., 2013).

Ainsi les signaux corticaux régissent l'orientation apico-basale du fuseau mitotique et de la division.

4.2 Fermeture de l'anneau et positionnement apical du midbody

Lors de la cytodierèse des cellules épithéliales, l'anneau contractile se forme perpendiculairement au plan des jonctions intercellulaires. Le midbody, formé à l'issue de la contraction de l'anneau, se retrouve toujours au pôle apical des

cellules. Chez la drosophile, des études, menées sur le notum, l'embryon ou l'épithélium folliculaire, mettent en avant deux phases lors de la fermeture de l'anneau : la première asymétrique et la seconde symétrique. Lors de la première phase, l'anneau se ferme du pôle basal vers le pôle apical, pouvant expliquer la localisation finale du midbody juste sous les jonctions adhérentes (Figure Y). Lors de cette phase, la composition protéique de l'anneau est elle aussi asymétrique et deux domaines distincts sont décrits, au-dessus et en-dessous du niveau des jonctions adhérentes. La partie basale de l'anneau est enrichie en Myosin II, Anillin et Septins (Founounou et al., 2013 ; Guillot et Lecuit, 2013, Herszterg et al., 2013 ; Morais-de-Sá et Sunkel, 2013). Toutefois, cette localisation asymétrique des composants de l'anneau ne semble pas être responsable de la constriction asymétrique. En effet, la réduction ou l'absence de Myosin II, Anillin ou Septins affecte la vitesse de fermeture de l'anneau mais n'affecte pas sa fermeture asymétrique (Guillot et Lecuit, 2013 ; Founounou et al., 2013). De plus, la constriction des filaments d'actomyosine est homogène sur toute la surface de l'anneau (Morais-de-Sá et Sunkel, 2013). Deux autres observations abondent dans le sens que la fermeture de l'anneau n'a pas d'impact direct sur la position finale du midbody. Contrairement aux cellules du notum qui ne dépasse pas du plan de l'épithélium, lors de la division des cellules du disque imaginal d'aile de drosophile, la membrane apicale s'arrondit au-dessus du plan des jonctions adhérentes. La fermeture de l'anneau est symétrique et le midbody se positionne au pôle apical, juste sous les jonctions adhérentes (Herszterg et al., 2013). Enfin, dans l'épithélium folliculaire de drosophile, une étude montre que quelle que soit la position apico-basale de l'anneau à la fin de sa fermeture, le positionnement final du midbody est apical (Morais-de-Sá et Sunkel, 2013). Quel est donc le mécanisme responsable de la localisation apical du midbody ?

La mutation de Rok (Rho kinase), régulant la phosphorylation de la Myosin, entraîne la réduction de l'activité de Myosin. Ceci n'empêche pas la fermeture de l'anneau même si celle-ci est ralentie. Cette mutation affecte également le positionnement apico-basal de l'anneau en fin de fermeture. A la fin de la

constriction, l'anneau peut alors être localisé plus basalement que dans les cas sauvages. Toutefois, le positionnement final du midbody en apical n'est, quant à lui, pas affecté. En revanche, la mutation de β -catenin (Arm chez la drosophile), qui lie E-Cadherine à α -catenin et donc au cytosquelette d'actine, entraîne une répartition aléatoire de l'anneau en fin de constriction mais également du midbody le long de l'axe apico-basal (Morais-de-Sá et Sunkel, 2013). Les auteurs de cette étude utilisent également une protéine de fusion entre E-Cadherine et α -catenin qui leur permet de sauver le phénotype observé dans le mutant *arm* et restaurer ainsi la localisation apicale du midbody. L'ensemble de leur étude permet de mettre en évidence le rôle des jonctions adhérentes dans la localisation apicale du midbody.

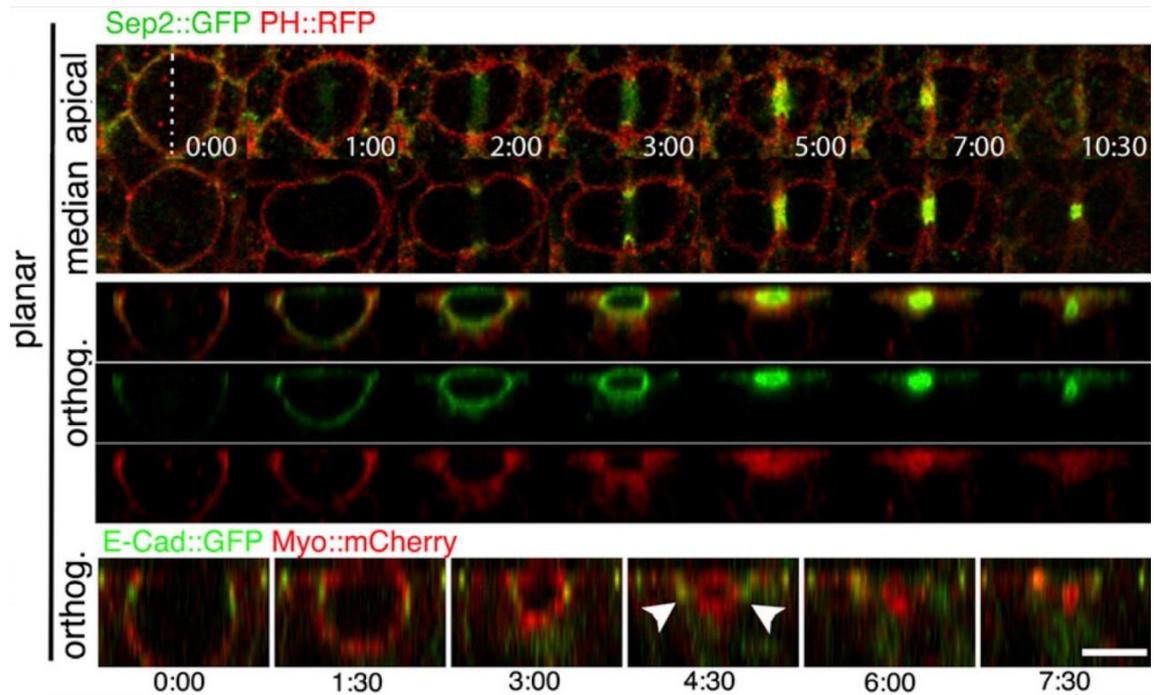


Figure Y : La fermeture de l'anneau contractile est polarisée dans les cellules épithéliales. Images de microscopie confocale en temps réel de cellules du thorax dorsal de drosophile exprimant des protéines associées à l'anneau contractile, Septin2::GFP (vert, panneaux du haut) et MyosinII::RFP (rouge, panneaux du bas), simultanément à des marqueurs de membrane plasmique (PH::RFP, rouge) ou de jonctions adhérentes (E-Cad::GFP, vert), respectivement. Les coupes orthogonales (orthog.) montrent la fermeture asymétrique de l'anneau contractile, du pôle basal vers le pôle apical de la cellule. Une fois fermé, l'anneau donne naissance au midbody, localisé juste sous le niveau des jonctions adhérentes (t=7min30, panneaux du bas). (Adapté de Founounou et al., 2013).

4.3 Les contacts adhésifs

4.3.1 Remodelage des jonctions adhérentes

Le maintien des contacts adhésifs au cours de la division est très important pour l'intégrité du tissu épithélial. Au moment de la fermeture de l'anneau, les jonctions adhérentes sont soumises à deux types de forces : l'une causée par la contraction de l'anneau et l'autre générée par les cellules voisines pour maintenir leur forme (Founounou et al., 2013 ; Guillot et Lecuit, 2013, Herzterg et al., 2013). Afin de former les nouveaux contacts adhésifs entre les cellules sœurs, un remodelage des jonctions adhérentes entre la cellule en division et ses voisines est nécessaire. Deux modèles sont proposés quant à l'organisation des membranes de ces cellules au moment de la cytotéière (Figure Z). Dans le premier modèle, décrit dans l'ectoderme de l'embryon de drosophile, les forces opposées, exercées à l'interface entre la cellule en division et sa voisine, entraînent le désengagement de E-Cadherin et la formation d'un espace entre la cellule en division et ses voisines (Guillot et Lecuit, 2013). Pour le second modèle, décrit sur le notum de drosophile au stade pupal, aucun espace n'est créé et la cellule en division reste connectée à ses voisines. Dans ce modèle, la dissociation entre la membrane plasmique et le cortex permet de soulager les tensions entre les cellules (Founounou et al., 2013 ; Herzterg et al., 2013). Les observations générées chez les vertébrés abondent dans le sens du second modèle. En effet, les études, menées sur l'intestin de souris ou plus récemment sur l'embryon de Xénope, montrent que les jonctions adhérentes et les jonctions serrées restent continues et connectées au niveau de l'ingression de membrane générée par la fermeture de l'anneau contractile (Jingunji et Ishikawa, 1992 ; Higashi et al., 2016). Chez la drosophile, un modèle, basé sur l'analyse des phénotypes induits par des mutations de *anillin* ou *septins*, suggère que le désengagement des jonctions adhérentes, entre la cellule en division et ses voisines, nécessite les forces générées par la fermeture de l'anneau contractile (Founounou et al., 2013 ; Guillot et Lecuit, 2013).

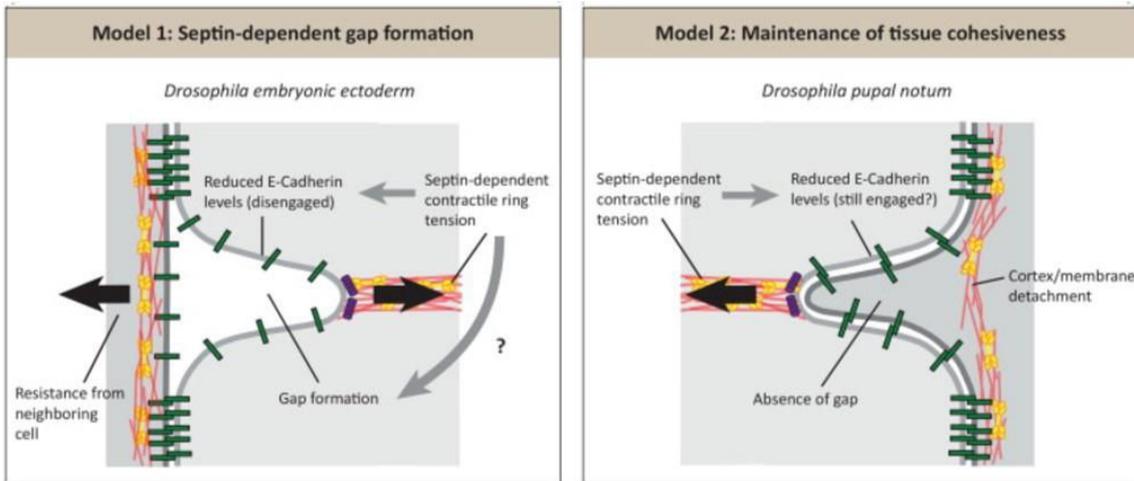


Figure Z : Deux modèles d'organisation des membranes au cours de la division des cellules épithéliales. Dans les deux modèles, la septine est nécessaire pour induire la diminution du niveau de E-Cadherine dans la zone d'ingression. Dans le premier modèle, proposé dans l'ectoderme de l'embryon de drosophile, l'application de forces opposées sur les jonctions adhérentes entraîne le désengagement des molécules de E-Cadhérine et la formation d'un espace entre les cellules en division et leurs voisines. Le second modèle, proposé dans le thorax dorsal de drosophile et l'intestin de souris, les cellules en division restent connectées à leurs voisines et aucun espace ne se forme. (Adapté de Herszterg et al., 2014).

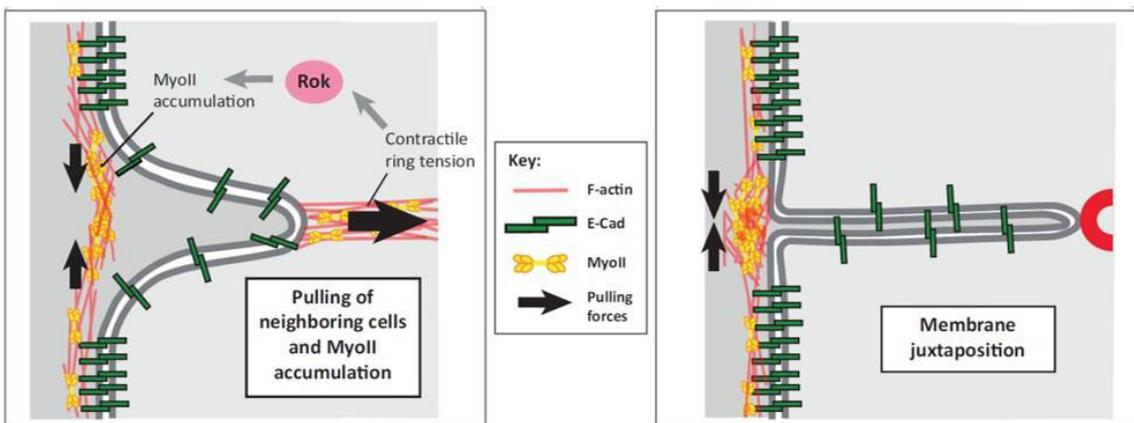


Figure AA : La juxtaposition des membranes permet la formation de la longue interface. Lors de la fermeture de l'anneau (gauche), les forces de traction, exercées par l'anneau contractile sur les cellules voisines, entraînent l'activation de la kinase Rho (Rok) et l'accumulation de Myosine II (MyoII) dans les cellules voisines. Au fur et à mesure que l'anneau se ferme et que le midbody se forme (droite), les tensions exercées par l'accumulation de MyoII dans les voisines induisent la juxtaposition des membranes, laissant les membranes des deux cellules filles en contact étroit. Toutefois, au moment de la juxtaposition, les membranes de cellules voisines sont toujours insérées entre les membranes des cellules filles. (Adapté de Herszterg et al., 2014)

4.3.2 Mise en place des nouvelles jonctions

Contrairement aux cellules isolées, dans la grande majorité des cas la division des cellules épithéliales aboutit à la formation d'une longue interface entre les cellules sœurs. Au niveau des jonctions adhérentes, la formation de cette longue interface est notamment favorisée par la juxtaposition des membranes. Celle-ci est permise par le recrutement de Myosin II par les cellules voisines à chaque extrémité de cette longue interface (Figure AA). Ce recrutement localisé de Myosin II permet le rapprochement des membranes. Simultanément, le retrait de la membrane des cellules voisines permet la formation de nouveaux contacts adhésifs entre les cellules sœurs (Founounou et al., 2013 ; Herszterg et al., 2013). Très récemment, Pinheiro et al. ont mis en évidence que les forces de tractions, générées par la fermeture de l'anneau, entraînaient l'élongation locale des jonctions, provoquant ainsi la dilution des molécules de E-Cadhérine au site d'ingression des membranes. Cette diminution de la concentration de E-Cadherine, couplée à la contractilité des cellules voisines, favorise l'organisation de l'actomyosine menant ainsi à l'accumulation de MyoII à chaque extrémité de la longue interface en formation (Pinheiro et al., 2017). La présence des cellules voisines, tirées au moment de la fermeture de l'anneau, permet le maintien de l'intégrité du tissu mais présente un obstacle à la formation des nouvelles jonctions entre les cellules sœurs.

4.3.3 Le rôle du midbody

Le midbody joue un rôle important dans le retrait des cellules voisines et la formation des nouvelles jonctions entre les cellules sœurs. En effet, la formation du midbody est accompagnée par une vague de polymérisation d'actine à proximité du midbody (Figure AB) et de la nouvelle interface entre les cellules sœurs (Herszterg et al., 2013 ; Morais-de-Sá et Sunkel, 2013). Cette accumulation d'actine est concomitante au retrait progressif de la membrane des cellules voisines et précède la formation des nouvelles jonctions adhérentes. La

diminution de la polymérisation de l'actine, *via* la mutation de composants du complexe Arp2/3 ou Rac, entraîne la réduction de l'interface apicale entre les cellules sœurs et dans certains cas, cette interface est inexistante. L'accumulation d'actine est donc nécessaire au retrait des cellules voisines pour permettre la formation de la nouvelle interface entre les cellules sœurs (Herszterg et al., 2013). Enfin, les auteurs ont montré que la polymérisation de l'actine est dépendante du midbody. Lorsque la position du midbody et la polymérisation de l'actine qui l'accompagne sont déplacées vers le pôle basal, c'est l'ensemble de la surface apicale qui est déplacé basalement. C'est donc la position du midbody qui définit la position de la nouvelle interface apicale entre les cellules sœurs. Le positionnement apical du midbody étant intimement lié au positionnement des jonctions adhérentes (voir plus haut), ces deux mécanismes se régulent mutuellement pour maintenir l'organisation apico-basale du tissu.

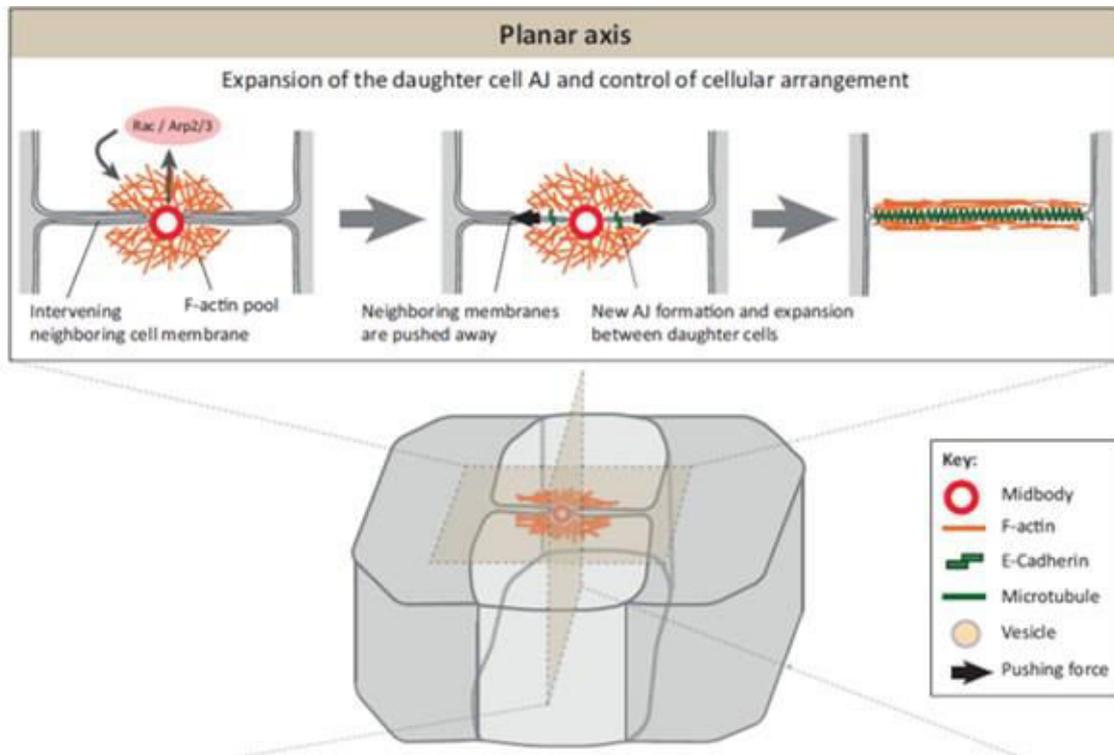


Figure AB : Le midbody joue un rôle dans le retrait des cellules voisines. Représentation schématique d'une cellule en division au moment de la formation du midbody. Le panneau du haut représente une coupe de la cellule présentée, dans le plan de l'épithélium. La polymérisation de l'actine (orange) autour du midbody (rouge), dépendante de Rac et Arp2/3, permet à la cellule en division de repousser les membranes de cellules voisines, intercalées au moment de la juxtaposition des membranes. Ce phénomène permet la formation et l'expansion des nouvelles jonctions adhérentes à l'interface entre les cellules sœurs. (Adapté de Herzberg et al., 2014).

4.4 La barrière de perméabilité

Si la transmission des jonctions adhérentes au cours de la division des cellules épithéliales a été décrite récemment, peu de choses sont encore connues concernant la transmission de la barrière de perméabilité. Chez les vertébrés, les premières données, obtenues sur tissu fixé, mettent en évidence le maintien des jonctions serrées entre la cellule en division et ses voisines (Jinguji et Ishikawa, 1992 ; Baker et Garrod, 1993). Plus récemment, Higashi *et al.* ont démontré par imagerie en temps réel, qu'une sonde colorée (la fluorescéine) était incapable de passer du pôle apical au pôle basal des cellules, y compris pendant la division cellulaire. Ces observations, réalisées dans l'embryon de Xénope, montrent que lors de la division, les jonctions serrées sont légèrement tirées vers le pôle basal mais la fluorescéine reste malgré tout toujours localisée au-dessus des jonctions serrées. Si les jonctions serrées sont affectées, alors la fluorescéine est en mesure de se propager vers le pôle basal des cellules. Cette étude est la première mise en évidence du maintien de la barrière de la perméabilité au cours de la division des cellules épithéliales (Higashi et al., 2016). Afin d'expliquer le maintien de la perméabilité membranaire, les auteurs s'intéressent à l'organisation des jonctions serrées au cours de la division. Ils observent alors que les jonctions serrées restent continues et connectées à l'anneau contractile tout au long de la division.

4.5 Les jonctions tri-cellulaires

Au niveau des jonctions adhérentes comme au niveau des jonctions septées ou serrées, la dynamique des jonctions tri-cellulaires au cours de la division des cellules épithéliales n'est que peu étudiée. Récemment, il a été montré que la localisation des jonctions tri-cellulaires des cellules en interphase joueraient un rôle dans l'orientation de la division des cellules épithéliales chez la drosophile (Bosveld et al., 2016). Dans ce cas, les jonctions tri-cellulaires recrutent Mud, une protéine associée à la dynéine, orientant ainsi les forces de tractions sur les

microtubules asexés. Chez les vertébrés, ce processus pourrait être conservé car l'homologue de Mud, NuMa, est également concentré au niveau des jonctions tri-cellulaires (Gloerich et al., 2017).

Au moment de la division des cellules épithéliales, deux nouvelles jonctions tri-cellulaires sont formées entre les cellules sœurs et leurs voisines, de part et d'autre de la longue interface formée entre les cellules sœurs. La néoformation des jonctions tri-cellulaires au cours de la division a été décrite très récemment dans l'embryon de Xénope (Higashi et al., 2016). Les auteurs décrivent l'apparition de points de Tricellulin de part et d'autre du midbody et du côté basal du midbody. De plus, ils mettent en évidence une chronologie dans les événements. Le recrutement d'Angulin précède celui de Tricellulin et les jonctions tri-cellulaires se forment d'abord d'un côté du midbody, puis de l'autre (Higashi et al., 2016).

4.6 Transmission de la polarité

De nombreuses études suggèrent que les cellules épithéliales maintiennent leur polarité apico-basale au cours de leur division (Figure AC). Ainsi il a été montré, dans des cellules MDCK (Madin-Darby Canine kidney), dans l'embryon de Xénope ou chez la drosophile, que notamment E-Cadherin, ZO-1 ou encore Crumbs préservent leur localisation apico-basale tout au long de la division (Baker et Garrod, 1993 ; Reinsch et Karsenti, 1994 ; Founounou et al., 2013 ; Higashi et al., 2016). La conservation ou non de la polarisation du complexe Par3/Par6/aPKC semble quant à elle dépendre du type cellulaire. Chez la drosophile, elle est maintenue dans l'ectoderme de l'embryon mais elle est partiellement perdue lors de la division des cellules épithéliales folliculaires de l'ovaire (Guillot et Lecuit, 2013 ; Morais-de-Sá et Sunkel, 2013). Enfin, la localisation des composants de jonctions septées ou de jonctions serrées au cours de la division est très peu décrite.

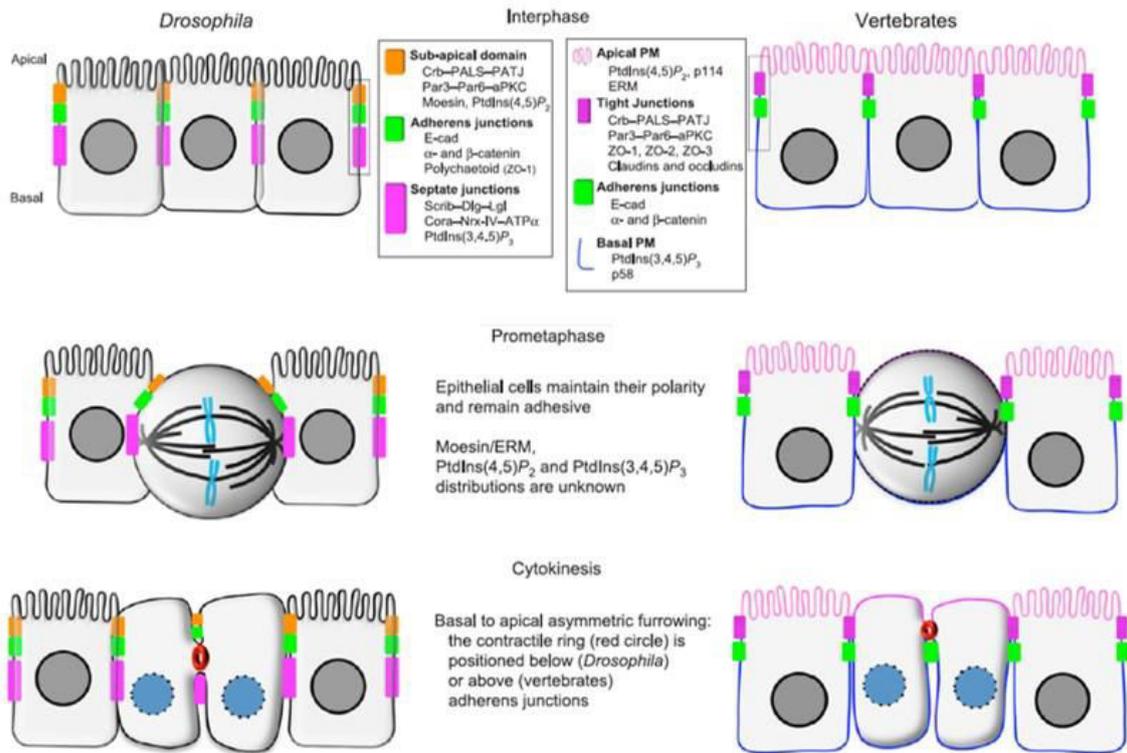


Figure AC : Distribution des marqueurs de polarité au cours de la division des cellules épithéliales. Au cours de leur division, les cellules épithéliales de drosophile (gauche) ou de vertébrés (droite) maintiennent la distribution apico-basale de leurs différents complexes jonctionnels, de leurs complexes de polarité et des phosphoinositides. Une différence majeure entre ces systèmes est la position finale du midbody par rapport aux jonctions adhérentes, en basal ou en apical des jonctions adhérentes pour la drosophile ou les vertébrés, respectivement. (Adapté de Le Bras et Le Borgne, 2014).

II- Objectifs de la thèse et résultats

1- Objectifs de la thèse

Notre corps est composé de nombreux tissus épithéliaux qui tapissent les cavités de l'organisme et jouent un rôle essentiel de barrières physique et chimique. La barrière physique est essentiellement assurée par les jonctions adhérentes qui maintiennent la cohésion entre les tissus. La barrière chimique est quant à elle assurée par les jonctions serrées chez les vertébrés et les jonctions septées chez les invertébrés, et permet de réguler le passage libre de molécules entre les cellules juxtaposées. Tout au long du développement et de la vie adulte, les tissus épithéliaux sont amenés à grandir et se régénérer. Ceci implique un grand nombre de divisions cellulaires. La division cellulaire des cellules épithéliales est peu étudiée contrairement à la division des cellules en culture qui est très bien décrite. A partir de la description de la division des cellules isolées, la première étape de ma thèse a consisté à décrire et comprendre les mécanismes impliqués dans la division des cellules épithéliales.

Pour maintenir l'intégrité du tissu épithélial, la nouvelle interface formée entre les cellules sœurs doit acquérir les caractéristiques d'une cellule épithéliale : les contacts adhésifs et la barrière de perméabilité doivent être mis en place. Au commencement de ma thèse, la mise en place des jonctions adhérentes était fraîchement décrite par plusieurs équipes (Founounou et al., 2013 ; Guillot et Lecuit, 2013, Herszterg et al., 2013). Ces travaux mettaient également en avant la fermeture asymétrique de l'anneau contractile menant à la formation du midbody juste sous les jonctions adhérentes, au niveau des jonctions septées, chez la Drosophile. Pour faire suite à ces travaux, je me suis intéressée au cours de ma thèse à la formation des nouvelles jonctions septées à l'interface entre les cellules sœurs et au devenir du midbody au sein de ces jonctions.

La nouvelle interface formée entre les cellules sœurs peut également être le siège d'une signalisation cellulaire. C'est le cas des précurseurs des organes sensoriels (SOP) chez la Drosophile. En effet, à l'issue de leur division, la voie de signalisation Notch se met en place de manière unidirectionnelle. Pour comprendre comment cette signalisation se met en place dans ces cellules, j'ai cherché à mettre en évidence les différences existantes entre la division symétrique des cellules épidermales et la division asymétrique des SOPs. Les résultats concernant cette dernière partie ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

2- Outils

Mes travaux se basent sur l'observation et la description de cellules épithéliales en division dans des tissus vivants. Ceci permet de suivre en temps réel la localisation et le devenir de protéines rapportrices, exprimées à des niveaux physiologiques et rendues fluorescentes, tout au long de la division. Au cours de mes travaux, j'ai observé deux types de tissus épithéliaux, le thorax dorsal et le disque imaginal d'ailes de Drosophile (Figure AD). Le thorax dorsal de drosophile (ou notum) est un neuro-épithélium cubique simple. Il est surmonté d'une cuticule rigide transparente qui laisse l'observation de l'épithélium relativement aisée. Au stade pupal, l'épithélium présente deux types de cellules : les cellules épidermales et les cellules précurseurs des organes sensoriels (SOP). Si les premières se divisent de manière symétrique et participent à la croissance du tissu, les secondes vont se diviser plusieurs fois de manière asymétrique pour générer l'organe sensoriel adulte composé de quatre cellules différenciées. Au stade pupal, l'animal est immobile, ce qui facilite son observation entre lame et lamelles tout en le maintenant vivant. Les disques imaginaires présents aux stades larvaires sont les prémices de certaines structures adultes telles que les pattes, les ailes, les yeux ou les antennes. Au moment de la métamorphose, ce sont les

seules structures conservées, le reste étant lysé. Ces structures se développent alors rapidement pour former l'animal adulte. Le disque imaginal d'aile (WID) est un épithélium colonnaire simple qui va donner naissance aux deux faces de l'aile ainsi qu'à une partie du thorax dorsal. Leur observation nécessite la dissection des larves mais le tissu peut être conservé vivant, si nécessaire, le temps de l'observation en le plaçant dans un milieu de culture. Sa transparence permet la visualisation facile de l'épithélium.

Ces échantillons épais sont placés face à l'objectif de microscopes confocaux permettant l'acquisition d'images de manière non invasive. Le génotype des animaux est modifié de sorte que les protéines d'intérêt soient fluorescentes et donc détectables grâce aux différentes longueurs d'ondes émises par les lasers des microscopes confocaux. Une fois l'acquisition terminée, les images sont analysées grâce au logiciel ImageJ. Ces deux types d'échantillons font également l'objet d'observations en microscopie électronique (Figure AD)

3- Résultats

Certains résultats présentés dans la suite de ce manuscrit ont été obtenus en collaboration avec Irina Kolotuev (Microscopie électronique), Marion Daudé (Réalisation du FRAP sur ATP α ::YFP, analyses et quantifications des données de FRAP, mutant *bark L200*) et Roland Le Borgne (Immuno-marquage des tissus fixés).

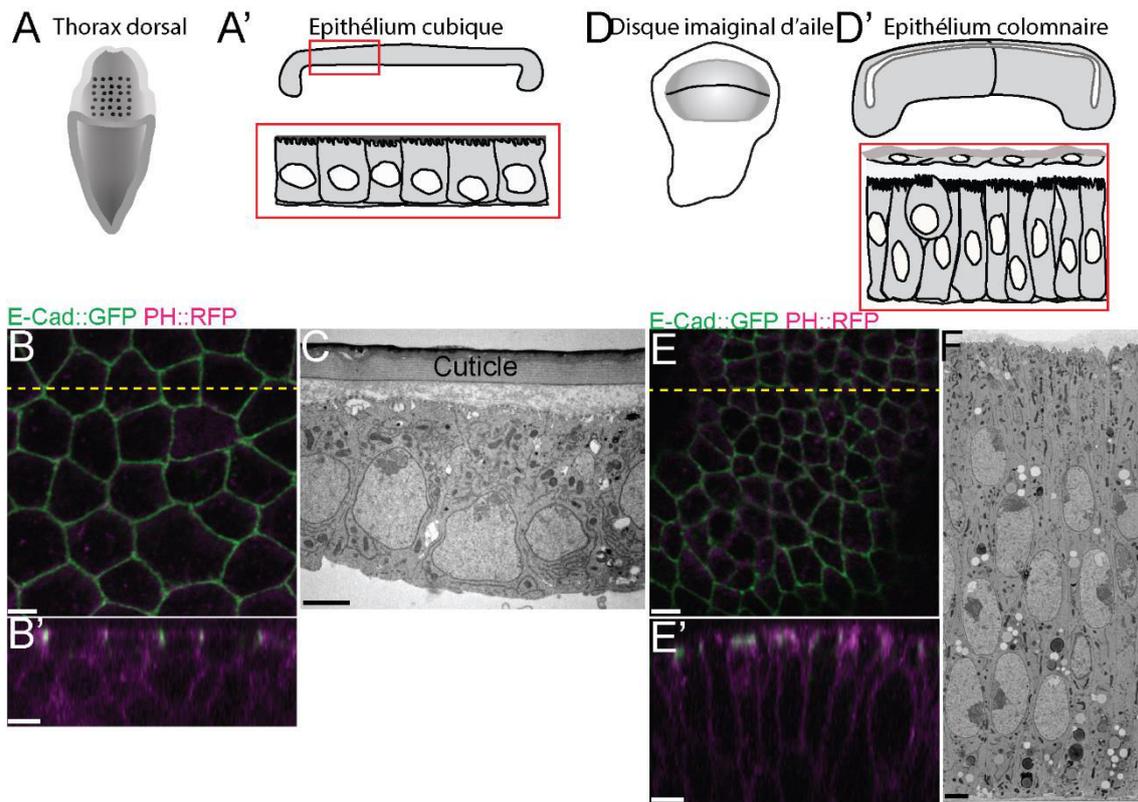


Figure AD : Le thorax dorsal et le disque imaginal d'aile de drosophile. (A-C) Au stade pupal, le thorax dorsal de drosophile est accessible en soulevant la case pupale (A). Cet épithélium cubique simple (A'), exprimant des protéines fluorescentes à un niveau physiologique, peut ainsi être observé en microscopie confocale (B, vue parallèle et B', vue orthogonale au plan de l'épithélium) pendant de longues heures, sans porter atteinte à la vie de l'échantillon. Ce tissu peut aussi être disséqué et fixé pour des observations en microscopie électronique (C). (D-F) Au stade larvaire L3, les disques imaginaux d'ailes de drosophile peuvent être extraits (D). Ils sont formés, entre autres, d'un épithélium colonnaire (D') Ils peuvent être conservés vivants pour des observations en microscopie confocale (E, vue parallèle et E', vue orthogonale au plan de l'épithélium) ou fixés pour des observations en microscopie électronique (F). Barre d'échelle : 3 μ m en B,B' et E,E', 2 μ m en C et F.

3.1 PARTIE I : L'abscission est retardée dans les cellules épithéliales malgré le recrutement de ESCRT-III.

La division cellulaire est un mécanisme très étudié et particulièrement bien décrit dans les cellules isolées. Nous nous intéressons précisément à la dernière étape de la division, la cytodierèse. La cytodierèse consiste en la fermeture de l'anneau contractile, aboutissant *in fine* à la séparation physique des cellules sœurs, l'abscission. Dans les cellules épithéliales, la cytodierèse est très peu investiguée, c'est pourquoi la première étape de notre étude consiste à décrire la chronologie des événements à partir de la transition métaphase / anaphase et de l'initiation de la constriction de l'anneau.

3.1.1 La maturation du midbody lors de la cytodierèse des cellules épithéliales.

Dans les cellules isolées, lors de la fermeture de l'anneau contractile, celui-ci est composé de Myosine, Actine, Aniline et Septines. Une fois fermé l'anneau contractile mature pour donner naissance au pont intercellulaire, le midbody, qui est dépourvu d'Actine. Nous avons observé ces différentes protéines, associées à un marqueur fluorescent, au cours de la division des cellules épithéliales. Les résultats sont présentés sous forme de kymographes. Ce procédé permet de visualiser l'évolution du marquage au cours du temps. Les kymographes sont focalisés sur le midbody. Pour réaliser les kymographes, la position du midbody, tout au long de l'acquisition, est artificiellement fixée grâce au logiciel imageJ. L'observation du thorax dorsal de *Drosophila* exprimant la Myosine II couplée au marqueur fluorescent RFP (Red Fluorescent Protein), MyoII::RFP, a permis de constater que MyoII::RFP reste localisée au niveau du midbody pendant plusieurs heures (Figure 1A, n = 66). Ainsi, MyoII::RFP constitue un bon marqueur du midbody. De la même manière, nous avons observé que les Septines restent également associées au midbody. En effet, Sep2::GFP (Septine 2 ; Green Fluorescent Protein) et Pnut::mCherry (Septine 7 chez l'homme) sont

localisées au niveau du midbody pendant au moins deux heures après la transition anaphase (Figure 1A, n=45 et n=18, respectivement). Enfin, la visualisation de l'Actine est permise par l'utilisation de la construction lifeAct-RFP. Ceci nous permet de constater la disparition de l'Actine au niveau du midbody 26 minutes (+/- 4min) après la transition anaphase (Figure 1A, n=27).

Afin de déterminer la dynamique des protéines associées au midbody, nous avons réalisé des expériences de recouvrement de fluorescence, appelée, dans la suite du manuscrit, expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Dix minutes après la transition anaphase, la fluorescence de MyoII::RFP ou de Pnut::mCherry est photo-blanchie (Figure 1B,B'). Pour permettre la visualisation du midbody, ces expériences de FRAP sont réalisées sur un tissu exprimant également Sep2::GFP. Les résultats mettent en évidence une absence de recouvrement de fluorescence après le photoblanchiment de MyoII::RFP ou Pnut::mCherry (Figure 1B-D, n=8 et n=6, respectivement). Il n'y a donc pas d'échange dynamique de ces protéines au niveau du midbody. Ainsi, à l'inverse de l'Actine qui disparaît du midbody, la Myosine II et les Septines sont associées de manière stable au midbody.

La maturation du midbody est nécessaire à l'étape finale de la cytotéière, l'abscission. Il est connu que cette étape est hautement régulée afin d'éviter tout défaut de ségrégation chromosomique. L'abscission nécessite la dépolymérisation des microtubules piégés par la fermeture de l'anneau. Elle est également contrôlée par le CPC qui inhibe l'abscission si du matériel génétique est présent au niveau du midbody. Enfin, le recrutement des protéines ESCRT permet la séparation physique définitive entre les cellules sœurs. Dans les cellules épithéliales, nous avons observé le comportement d'une protéine associée aux microtubules, Jupiter, ainsi que de deux composants du CPC, Survivin (Svv) et Aurora B (AurB), et un composant du complexe ESCRT-III, Shrub (Shrb/CHMP4/Snf7). Jupiter::GFP a permis de mettre en évidence la dépolymérisation des microtubules à 42 minutes (+/- 6min) après la transition

anaphase (Figure 1A, n=20). Dans un même intervalle de temps, nous avons observé la disparition du midbody des composants du CPC, Svv::GFP et AurB::GFP (Figure 1A, 40minutes +/-5min, n=7 et 45 minutes +/- 7min, n=15, respectivement). A ce stade de la division, il n'y a donc plus d'obstacles connus à la mise en place de l'abscission. Enfin, pour visualiser les ESCRT-III, nous surexprimons la protéine Shrb::GFP aléatoirement dans quelques cellules du tissu par le biais de l'outil Ay-GAL4 (Figure S1A). Nous obtenons ainsi un tissu mosaïque exprimant également MyoII::RFP permettant le suivi du midbody. Le recrutement de la protéine du complexe ESCRT-III, Shrb::GFP, au niveau du midbody, est observé 22 minutes (+/- 8min) après la transition anaphase (Figure 1A, n=14).

Ces observations sur la maturation progressive du midbody sont appuyées par des observations de microscopie électronique, réalisée au sein du laboratoire par Irina Kolotuev. Irina décrit les changements morphologiques du pont intercellulaire par deux techniques de microscopie électronique, la microscopie électronique à transmission (TEM) et la SBF-SEM (Serial Block Face Scanning Electron Microscopy). Cette dernière technique permet la réalisation de coupes sériées et leur observation afin de permettre à terme une reconstruction en 3 dimensions du tissu ou de la structure d'intérêt. Le midbody est ainsi caractérisé par la présence de microtubules antiparallèles (Figure 1E, F). A un stade intermédiaire de sa maturation, le pont intercellulaire commence à s'affiner et la majorité des microtubules a disparu (Figure 1 F') pour finalement aboutir à un pont intercellulaire complètement dépourvu de microtubules et connectant toujours les deux cellules sœurs (Figure 1F''). Les différentes étapes de maturation du pont intercellulaire sont confirmées, par les mêmes techniques, dans le disque d'aile (Figure S1B-B''). Enfin, Irina décrit également des ponts intercellulaires à l'intérieur de compartiments intracellulaires (Figure 1G), probablement le résultat d'une internalisation du pont intercellulaire par l'une des cellules. Les coupes sériées permettent de mettre en évidence que le pont

intercellulaire est ouvert sur le cytosol d'un côté (Figure 1G, flèche jaune), tandis que l'autre côté fait face à une membrane (Figure 1G, flèche rouge). Cette dernière observation est la première preuve que l'abscission est effective dans les cellules épithéliales.

Tenant compte des observations réalisées en temps réel par microscopie photonique et des observations de microscopie électronique, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'abscission a bien lieu dans les cellules épithéliales. Dans les cellules du thorax dorsal de *Drosophile*, notre prédiction est la survenue de l'abscission environ 45 minutes après la transition anaphase. A ce stade en effet, les régulateurs de l'abscission ont disparu et les ESCRT-III sont d'ores et déjà recrutées.

3.1.2 Le recrutement de ESCRT-III n'est pas corrélé à l'abscission dans les cellules épithéliales.

Afin de tester notre hypothèse selon laquelle l'abscission a lieu environ 45 minutes après la transition anaphase, nous mettons en place des expériences de photo-conversion de protéines solubles. La KAEDE est une protéine de corail, naturellement photo-convertible, formant un homo-tétramère de 116 kDa. La KAEDE émet une fluorescence verte. Une excitation à 405nm entraîne la photo-conversion irréversible de la KAEDE qui émet alors une fluorescence rouge (Figure 2A). Grâce aux outils génétiques disponibles chez la drosophile, nous exprimons la KAEDE dans les cellules du thorax dorsal. Ces cellules expriment simultanément ATP α ::YFP, un composant des jonctions septées permettant de visualiser les contours cellulaires (Figure 2B). Le principe de l'expérience est de photo-convertir la KAEDE dans une des cellules sœurs (cellule 1) à différents temps après la transition anaphase, le but étant de déterminer le temps de l'abscission. Avant abscission, la KAEDE photo-convertie sera capable de diffuser dans la cellule sœur (cellule 2) *via* le midbody. A l'inverse, après abscission, la KAEDE n'est plus en mesure de diffuser dans la cellule sœur, les

cytoplasmes étant définitivement séparés (Figure 2A). De manière surprenante, cette expérience a montré que 3 heures (Figure 2B), voire même 5 heures (données non présentées) après la transition anaphase, la KAEDE est toujours en mesure de diffuser dans la cellule sœur, et uniquement dans la cellule sœur. Des résultats similaires sont obtenus avec la protéine photo-activable Tubuline-PA (données non présentées). Dans les cellules épithéliales, malgré le recrutement de ESCRT-III et la disparition des régulateurs de l'abscission au niveau du midbody, l'abscission n'a pas lieu immédiatement.

3.1.3 L'abscission prend place avant la division.

Les cellules épithéliales que nous observons ont la particularité de se diviser à un temps déterminé (entre 16 et 18 heures après la formation de la puppe) et de ne pas entrer de nouveau en division dans l'intervalle de temps où nous pouvons les observer. En me basant sur l'étude récente selon laquelle l'abscission serait un événement de la phase G1 (Gershony et al., 2014), j'ai décidé de réaliser ces mêmes expériences de photo-conversion, cette fois, avant la division. Dans le même fond génétique, j'ai ainsi photo-converti la KAEDE aléatoirement dans plusieurs cellules environ 15 heures après la formation de la puppe. A ce stade, j'ai pu observer deux cas de figures : le premier cas est la diffusion de la KAEDE à une cellule voisine, fort probablement la cellule sœur (données non présentées) ; le second cas est la restriction de la KAEDE à la cellule photo-convertie (Figure 2C, n=5). Les cellules photo-converties sont ensuite imagées jusqu'à la transition anaphase (Figure 2C, entre t=31min et t=36min). De manière très intéressante, cette expérience m'a permis de mettre en évidence que l'abscission prenait place, dans ces cellules, environ 70 minutes avant la transition anaphase (Figure 2D).

3.1.4 Un autre rôle des ESCRTs dans la division des cellules épithéliales.

Le thorax dorsal de *Drosophila* présente un type cellulaire particulier, les SOPs. Nous savons que les cellules sœurs, issues de la division des SOPs, vont entrer

en division plus de 2 heures après la division des SOPs et de manière quasi simultanée. Lors de la division des SOPs, nous avons établi que Shrb::GFP est recrutée au niveau du midbody environ 60 minutes après la transition anaphase. Les résultats préliminaires, confirmés depuis par Marion Daudé, d'expériences de KAEDE réalisées dans ces cellules montrent que l'abscission est effective dans un même intervalle de temps, entre 60 et 70 minutes. Dans ce type cellulaire, le recrutement de ESCRT-III est donc immédiatement suivi de l'abscission. Pour comprendre cette différence entre les cellules épidermales et les SOPs, nous nous sommes intéressés de manière plus précise à la localisation de Shrb::GFP à proximité du midbody (Figure 3A-B'). Nous avons ainsi noté une différence entre les cellules épidermales et les SOPs. Sur une coupe orthogonale coupant le midbody, dans les cellules épidermales, Shrb::GFP est recrutée au-dessus du midbody (Figure 3A', flèche rouge). Dans les SOPs, Shrb::GFP est recrutée de part et d'autre et dans l'axe du midbody (Figure 3B'), comme précédemment décrit dans les cellules isolées. Le recrutement de Shrb::GFP au niveau du midbody dans les cellules épidermales pourrait ne pas être corrélé avec son implication dans l'abscission.

Les tissus mosaïques exprimant Shrb::GFP et MyoII::RFP m'ont permis d'observer la division de cellules n'exprimant pas Shrb::GFP (Figure 3C, pointillés jaunes), mais entourées de cellules exprimant Shrb::GFP. De manière intéressante, j'ai observé le recrutement de Shrb::GFP au niveau du midbody, par les cellules voisines, environ 15 minutes après la transition anaphase (Figure 3C, flèches rouges et Figure S2A). Dans les cellules épithéliales, les ESCRT-III sont donc recrutées au niveau du midbody, à la fois par la cellule en division et par les cellules voisines. Ces observations posent la question du rôle des ESCRTs au cours de la cytotéiérèse des cellules épithéliales ?

Pour investiguer le rôle de Shrb, nous avons généré des tissus mosaïques présentant des îlots de cellules mutantes *shrb*^{O3}. Compte tenu de la littérature, notre hypothèse était que les cellules resteraient connectées entre elles car

incapables d'entreprendre l'abscission. Des expériences de photo-conversion de la KAEDE mènerait alors à l'observation de la diffusion de la KAEDE dans plusieurs cellules, restées connectées par plusieurs ponts intercellulaires, et non dans l'unique cellule sœur. A l'inverse, de manière inattendue, les expériences de KAEDE menées dans les îlots de cellules mutantes *shrb^{O3}* ont révélé que la KAEDE persistait dans une et une seule cellule, la cellule photo-convertie (Figure S2B, n=5). Il faut noter toutefois que nous n'observons aucune division dans les îlots de cellules mutantes pour *shrb^{O3}*, seules quelques cellules mutantes, isolées dans le tissu, se divisent. De plus, nous avons observé la délamination et la mort de l'ensemble de ces cellules à long terme (données non présentées).

L'imagerie en temps réel et les immunomarquages réalisés sur ces tissus ont mis en évidence une désorganisation des cellules épithéliales mutantes pour *shrb^{O3}*. En effet, le suivi de ATP::YFP et les marquages de Fas3, Dlg et Gli ont montré une réduction du marquage de ces protéines des jonctions septées entre les cellules mutantes *shrb^{O3}* ainsi qu'entre les cellules mutantes et leurs voisines sauvages (Figure 3D, E et Figure S2C, D). Dans un premier temps, seules les jonctions septées sont affectées. Les jonctions adhérentes, marquées par E-Cadhérines restent intactes. Toutefois, dans des îlots de cellules mutantes *shrb^{O3}* de grande taille, les jonctions adhérentes sont également affectées et les cellules quittent le plan de l'épithélium (données non présentées). Enfin, des observations de microscopie électronique sur ces cellules mutantes *shrb^{O3}* ont mis en évidence un défaut de juxtaposition des membranes au niveau du midbody. On peut ainsi observer un trou dans le tissu au niveau du pont intercellulaire (Figure 3F, F'), phénomène inexistant dans un tissu sauvage (Figure 3G, G').

En conclusion, la localisation de Shrb au-dessus du midbody, son recrutement par les cellules voisines ainsi que le fait que les jonctions septées soient affectées en son absence, peuvent amener à penser à un potentiel rôle des ESCRT-III dans le maintien de l'intégrité épithéliale au cours de la division cellulaire et notamment à un rôle dans l'assemblage ou le maintien des jonctions septées.

Figure 1

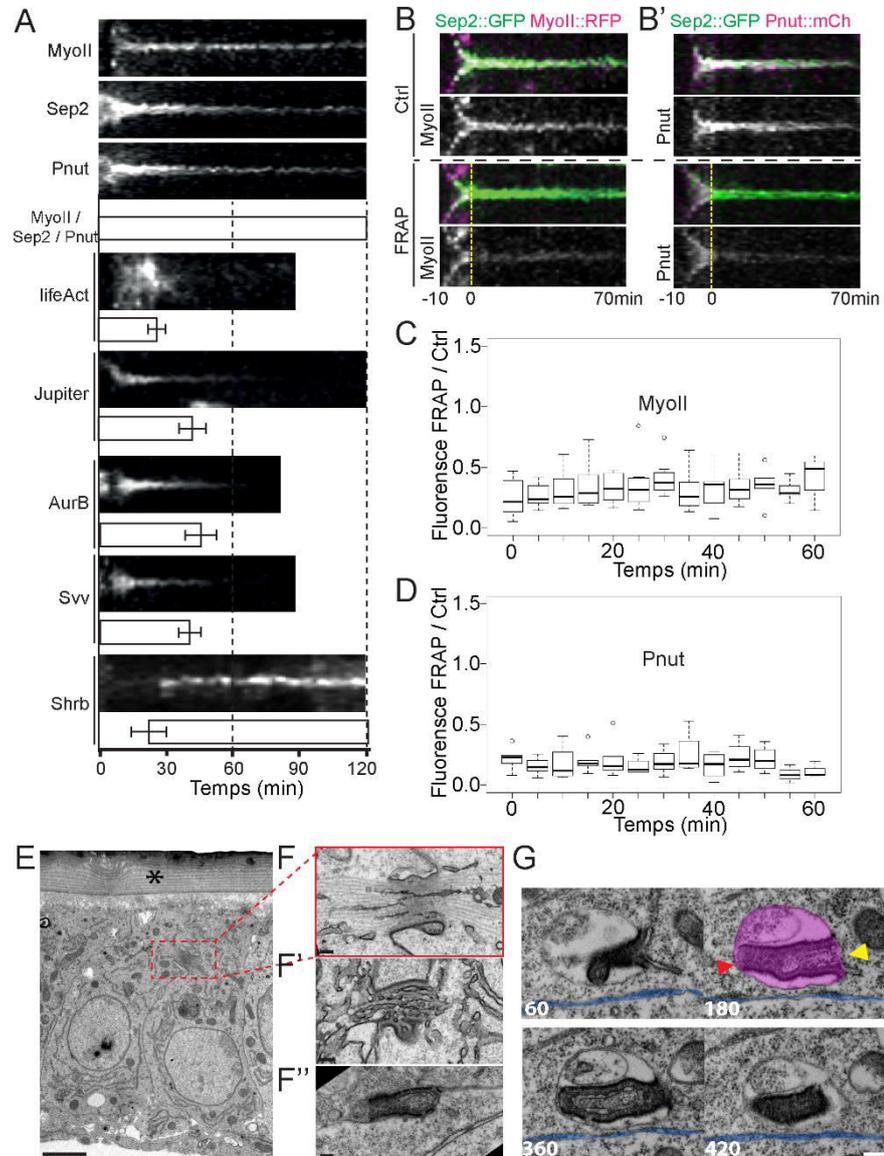


Figure 2

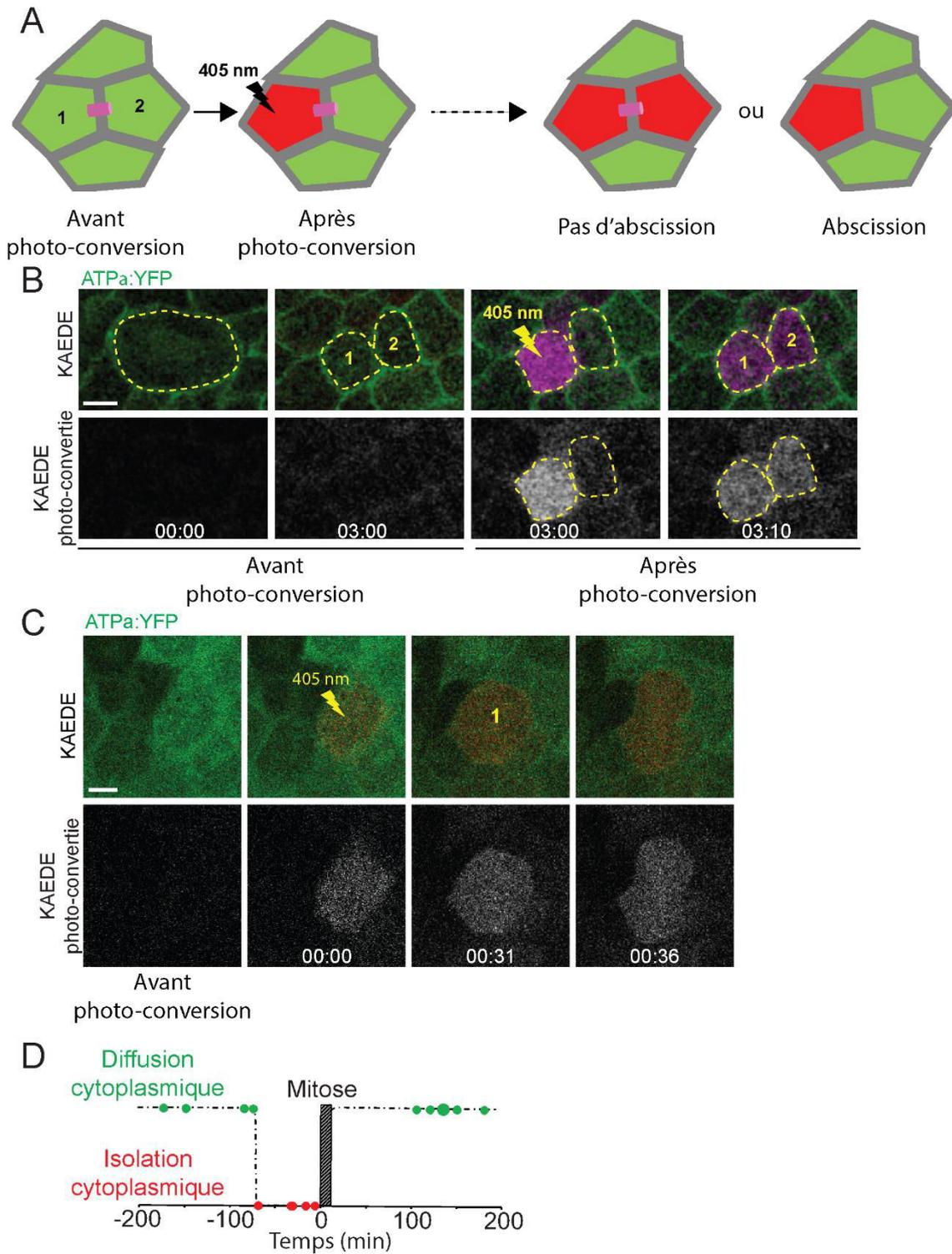


Figure 3

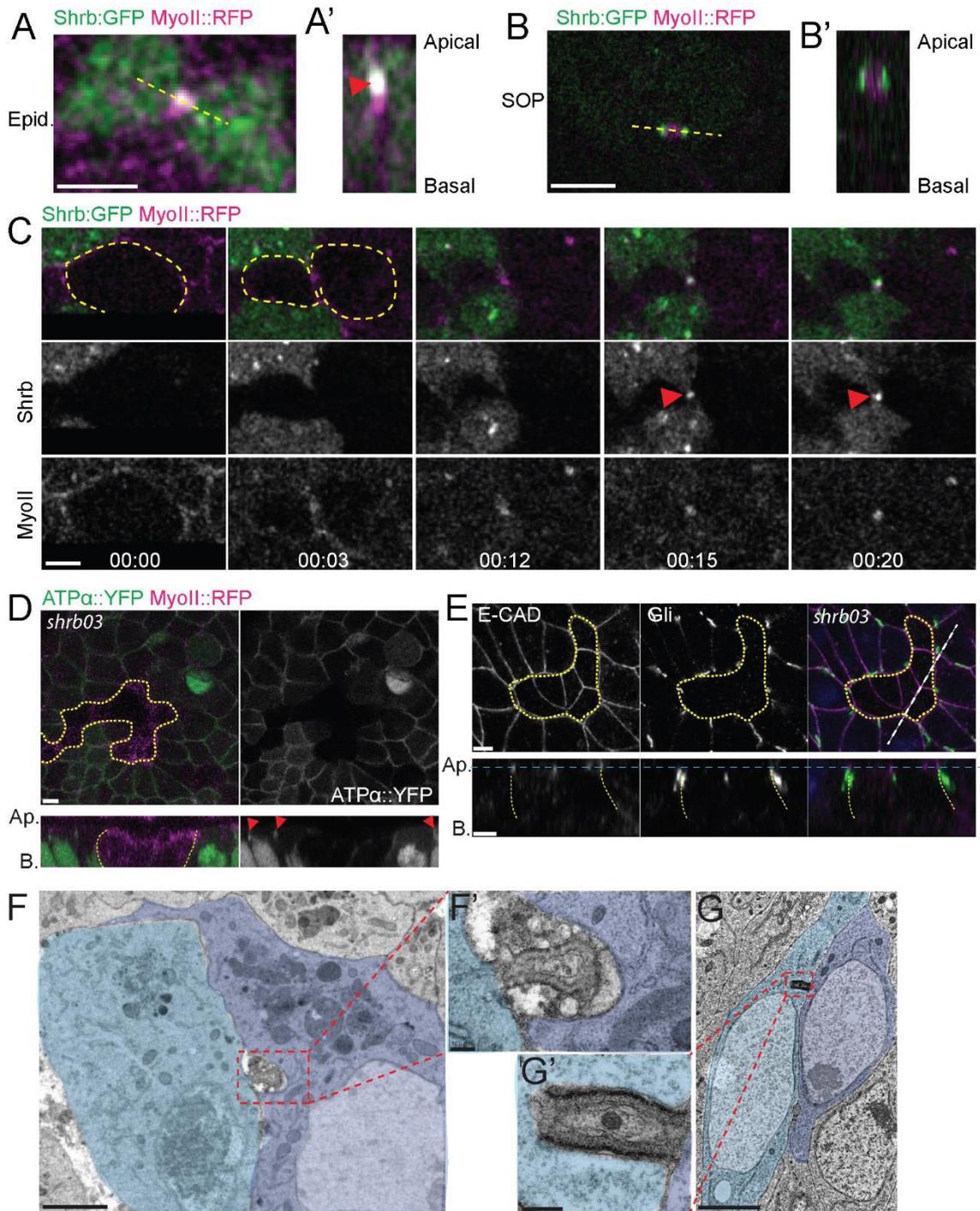


Figure S1

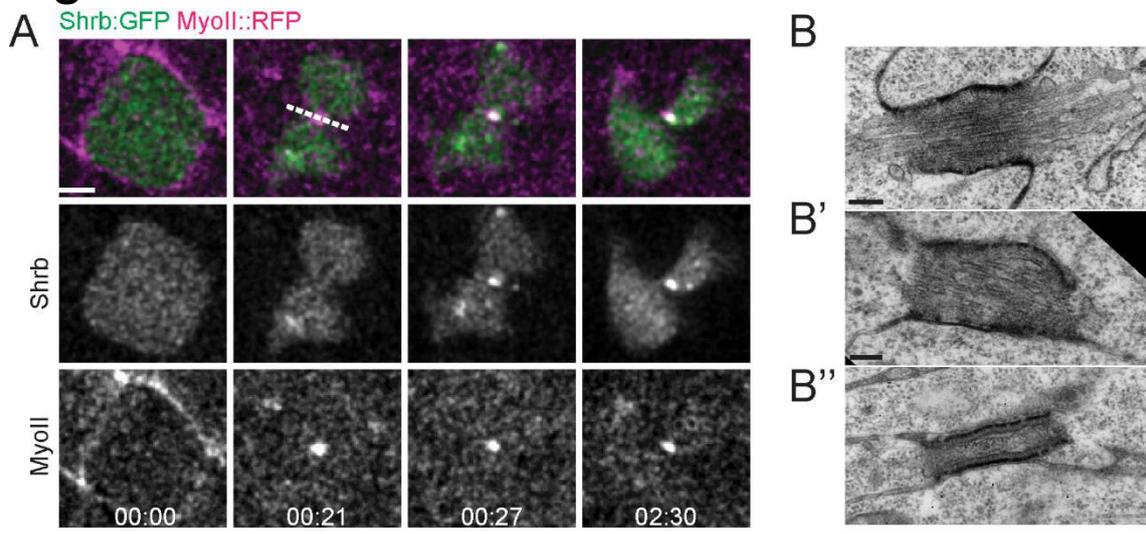
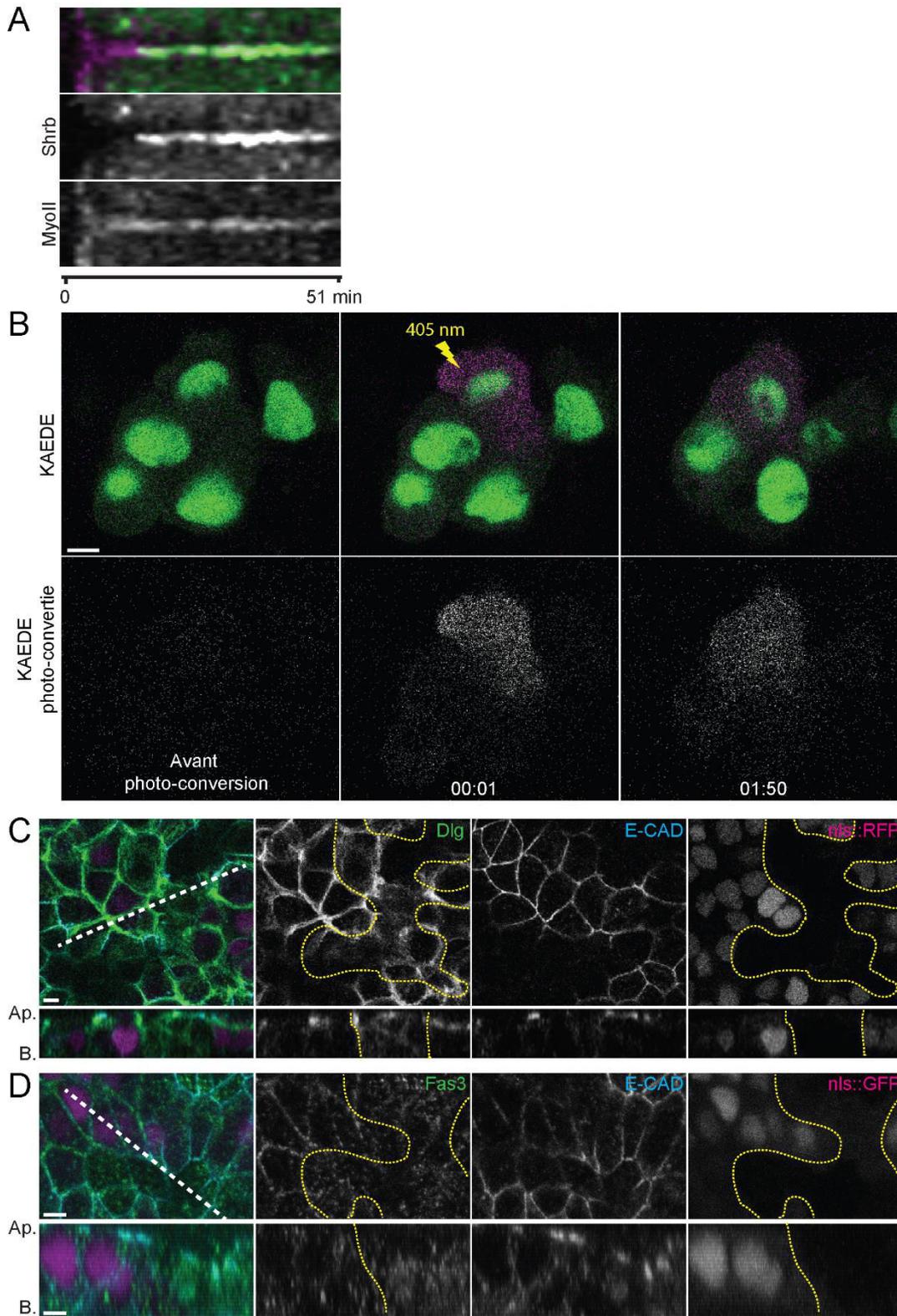


Figure S2



Légendes des figures

Figure1 : Maturation du midbody lors de la cytotélière des cellules épithéliales.

(A) Kymographes dans le plan du midbody et quantification du temps de résidence au midbody de MyoII::RFP (n=66), Septin2::GFP (n=45), Pnut::mCherry (n=18), lifeAct-RFP (n=27), Jupiter::GFP (n=20), AuroraB::GFP (n= 15), Survivin::GFP (n=7) et Shrub::GFP (n=14).

(B,B') Kymographes dans le plan du midbody de MyoII::RFP (magenta ou gris en B) ou Pnut::mCherry (magenta ou gris en B') imagés simultanément à Sep2::GFP (vert). Le photoblanchiment de MyoII::RFP ou Pnut::mCherry (panneaux du bas) est réalisé 10 minutes après la transition anaphase (ligne pointillée jaune).

(C,D) Graphes de quantification du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment de MyoII::RFP (C, n=8) ou Pnut::mCherry (D, n=6).

De A à D, le temps est en minutes. Le t=0 correspond à la transition métaphase / anaphase.

(E-F'') Image de microscopie électronique à transmission d'une cellule en division en vue apico-basale et parallèle au midbody (le pôle apical est en haut, * marque la cuticule en E). (F) Fort grossissement du midbody contenant des microtubules antiparallèles, présenté en E. (F',F'') Forts grossissements d'un pont intercellulaire en maturation montrant la disparition progressive des microtubules et leur remplacement par de la membrane interne (F') et d'un pont intercellulaire stable (F''), respectivement.

(G) Image de microscopie électronique à transmission de très fines coupes sériées, parallèles à un pont intercellulaire de cellules de disque imaginal d'aile de Drosophile prisonnier d'une organelle d'endocytose (magenta). L'abscission a eu lieu à une extrémité du pont intercellulaire (flèche rouge) alors que l'autre extrémité est toujours ouverte sur le cytoplasme (flèche jaune). La membrane

plasmique est surlignée en bleu. Les nombre font référence à la distance séparant les différentes sections en nm.

Barre d'échelle : 2µm en E et 200nm en F-G.

Figure 2 : Le recrutement de Shrb n'est pas corrélé à l'abscission dans les cellules épithéliales.

(A) Représentation schématique du principe des expériences de photo-conversion. L'excitation laser à 405nm, ciblée dans la cellule 1, a pour conséquence de photo-converter la KAEDE d'une fluorescence verte à une fluorescence rouge. La KAEDE photo-convertie est capable de diffuser à travers le pont intercellulaire tant que l'abscission n'a pas lieu entre les cellules sœurs 1 et 2.

(B) Imagerie confocale en temps réel d'une cellule exprimant ATPα::YFP (vert) simultanément à la KAEDE (vert puis magenta). Les cellules 1 et 2, issues de la division, sont entourées par une ligne pointillée jaune. La photo-conversion de la KAEDE à 405nm (éclair jaune) est réalisée dans la cellule 1, trois heures après la transition anaphase.

(C) Imagerie confocale en temps réel d'une cellule exprimant ATPα::YFP (vert) simultanément à la KAEDE (vert puis rouge). La photo-conversion de la KAEDE à 405 nm (éclair jaune) est réalisée aléatoirement dans une cellule. La cellule entre en division environ 30 minutes après la photo-conversion. Cette donnée montre que l'isolation cytoplasmique a lieu avant la division.

(D) Représentation graphique des différents essais de photo-conversion de la KAEDE à différents temps, avant ou après la division. L'isolation cytoplasmique des cellules épithéliales du thorax dorsal de Drosophile se situe autour de 70 minutes avant l'entrée en division.

En B-C, le temps est en h:min. En D, le temps est en min. Barre d'échelle : 3µm.

Figure 3 : Un nouveau rôle de Shrb dans l'assemblage et/ou le maintien des jonctions septées.

(A-B') Image de microscopie confocale d'une cellule épidermale (A,A') et d'une SOP (B-B') exprimant simultanément Shrb::GFP (vert) et MyoII::RFP (magenta). (A,B) vues parallèles au plan de l'épithélium, (A',B') coupes orthogonales au plan de l'épithélium et coupant le midbody dans sa longueur (pointillés jaunes). Dans les cellules épidermales, Shrb::GFP s'enrichit en apical du midbody (A', flèche rouge).

(C) Imagerie confocale en temps réel d'une cellule en division (délimitée par la ligne pointillée jaune) exprimant MyoII::RFP (magenta) et entourée de cellules exprimant Shrb::GFP (vert). Le signal Shrb::GFP apparaissant à proximité du midbody à t=15min (flèches rouges) est exprimé par les cellules voisines à la cellule en division.

(D) Tissus mosaïques présentant des îlots de cellules mutantes *shrb^{O3}* (lignes pointillées jaunes) et exprimant ATPα::YFP (vert, simultanément à nls-GFP) et MyoII::RFP (magenta) en vue parallèle (panneaux du haut) ou orthogonale (panneaux du bas) au plan de l'épithélium.

(E) Tissus mosaïques présentant des îlots de cellules mutantes *shrb^{O3}* (lignes pointillées jaunes) marqués pour Gli (vert) et E-Cad (magenta) en vue parallèle (panneaux du haut) ou orthogonale (panneaux du bas) au plan de l'épithélium.

(F-G') Sections de microscopie électronique à transmission de cellules (disque imaginal d'aile) en division déplétées de *shrb* (F,F') comparé au contrôle (G,G').

En C, le temps est en h:min. Barre d'échelle : 3µm en A-E, 2 µm en F,G et 200nm en F',G'.

Figure S1 (relative à la figure 1) : Maturation du midbody lors de la cytotélière des cellules épithéliales.

(A) Imagerie confocale en temps réel d'une cellule en division exprimant Shrb::GFP (vert) et MyoII::RFP (magenta). Le film, focalisé dans le plan du midbody grâce au logiciel ImageJ, permet de générer un kymographe (présenté en Figure 1A) dans le plan du midbody (ligne pointillée blanche).

(B-B'') Sections de microscopie électronique à transmission, de cellules du disque imaginal d'aile, générées parallèlement au midbody où les microtubules sont toujours présents (B), commencent à disparaître (B') et jusqu'à la formation du pont intercellulaire stable (B'').

En B, le temps est en h:min. Barre d'échelle : 3µm en A et 200nm en B-B''.

Figure S2 (relative à la figure 3) : Shrb, recrutée par les cellules voisines, semble jouer un rôle dans le maintien des jonctions septées.

(A) Kymographe, relatif la figure 3C, focalisé sur le midbody d'une cellule exprimant MyoII::RFP (magenta) entourée de voisines exprimant Shrb::GFP (vert).

(B) Imagerie confocale en temps réel d'un îlot de cellule mutantes *shrb^{O3}* exprimant nls-GFP (noyaux verts) et la KAEDE (vert puis magenta). La photo-conversion de la KAEDE est réalisée aléatoirement dans une seule cellule de l'îlot (éclair jaune).

(C-D) Tissus mosaïques présentant des îlots de cellules mutantes *shrb^{O3}* en vue parallèle (panneaux du haut) ou orthogonale (panneaux du bas) au plan de l'épithélium et marqués pour Dlg (vert en C) ou Fas3 (vert en D) et E-Cad (bleu).

En B, le temps est en h:min. Barre d'échelle : 3µm.

3.2 PARTIE II : L'assemblage orienté des jonctions septées permet de conserver l'intégrité du tissu épithélial au cours de la cytodierèse.

Les tissus épithéliaux sont composés de cellules juxtaposées en contact très étroit les unes avec les autres. Au cours de la division des cellules épithéliales, un remodelage des jonctions est nécessaire afin de désengager les contacts avec les cellules voisines et créer de nouveaux contacts entre les cellules sœurs. Si le remodelage des jonctions adhérentes est décrit par plusieurs études (Founounou et al., 2013 ; Guillot et Lecuit, 2013, Herszterg et al., 2013), ce qu'il se passe au niveau des jonctions septées est inconnu à ce jour. Ces études ont également mis en évidence la fermeture asymétrique de l'anneau et la formation du midbody en apical, juste sous les jonctions adhérentes.

3.2.1 Les cellules voisines restent connectées au niveau du midbody.

Dans un premier temps, pour décrire le comportement des jonctions septées au cours de la division des cellules épithéliales, j'ai observé un tissu exprimant conjointement ATP α ::YFP et MyoII::RFP (Figure 4A et S3A-C). ATP α ::YFP est un marqueur des jonctions septées tandis que MyoII::RFP permet la visualisation du midbody tout au long de la cytodierèse (Figure 4A et S4B, flèches rouges). Cette première expérience m'a permis de mettre en évidence la forme d'haltère que prend la cellule en division au niveau des jonctions septées. A niveau de l'étranglement généré par la fermeture de l'anneau, j'ai noté la déformation en forme de doigt des cellules voisines qui restent au contact du midbody (Figure 4A et S4B, pointillés jaunes). Pour mieux comprendre et visualiser ce contact entre les cellules voisines et le midbody de la cellule en division, j'ai généré des tissus mosaïques de cellules exprimant ou non ATP α ::YFP (Figure B-B'''). Dans ce tissu, toutes les cellules expriment MyoII::RFP. Si nous observons la division d'une cellule dépourvue de ATP α ::YFP (Figure 4B, pointillés jaunes) entourée de cellules exprimant ATP α ::YFP, la présence de ATP α ::YFP au niveau du midbody est uniquement le fait de la cellule voisine. Un grossissement de cette cellule en

division (Figure 4B, encadré rouge) permet de constater que la longue interface de jonctions adhérentes, marquées par MyoII::RFP, est rapidement formées entre les cellules sœurs (Figure 4B'). En revanche, quelques microns plus basalement, au niveau des jonctions septées, les cellules voisines restent connectées au midbody de la cellule en division pendant plus de 2h30 (Figure 4B''). La cytodièrese des cellules épithéliales fait donc intervenir quatre cellules, les deux cellules issues de la division et les deux cellules voisines dont la membrane est tirée par la constriction de l'anneau contractile. Le fort grossissement obtenu par la microscopie électronique permet de confirmer le contact étroit entre les cellules voisines et le midbody de la cellule en division (Figure 4C-E). Le contact entre les quatre cellules est aussi visible sur les reconstructions 3D générées par Irina Kolotuev (Figure 4F-H') et sur lesquelles la reformation des jonctions adhérentes en apical du midbody est également observable (Figure 4G). Des résultats similaires sont obtenus dans un autre tissu épithélial, le disque imaginal d'aile de Drosophile (Figure S3D-F).

3.2.2 Les nouvelles jonctions septées se forment au-dessus du midbody.

L'observation des cellules en division exprimant ATP α ::YFP et MyoII::RFP m'a permis de constater que de manière stéréotypée, le midbody qui se forme en apical sous les jonctions adhérentes (Figure 5A-A'), opérait une lente migration vers le pôle basal de la cellule (Figure 5B). Afin de quantifier cette observation préliminaire, j'ai mesuré la distance séparant la nouvelle jonction adhérente et le midbody tout au long de la migration du midbody (Figure 5C). Par ce biais, j'ai mis en évidence deux phases de migration : une phase lente lorsque le midbody est présent au sein des jonctions septées (0.066 μ m/min +/- 0.055, à 25°C), et une seconde phase, plus rapide, lorsqu'il quitte les jonctions septées et accélère sa migration vers le pôle basal (0.157 μ m/min +/- 0.129 à 25°C). Pour la suite des expériences et notamment pour la comparaison avec des situations mutantes, il est important de noter que la température ambiante influence aussi bien la vitesse de fermeture de l'anneau (données non présentées) que la vitesse

de migration du midbody. Les expériences de microscopie électronique permettent de répartir les différents stades de maturation du pont intercellulaire le long de l'axe apico-basal dans le thorax dorsal (Figure 5D) et dans le disque d'aile (Figure 5E). Plus explicite dans l'épithélium colonnaire du disque d'aile, ceci a permis de corrélérer la maturation du midbody et sa migration vers le pôle basal. En effet, la majorité des midbody présentant des microtubules sont localisés en apical, juste sous les jonctions adhérentes (Figure 5D-E, magenta) tandis que les ponts intercellulaires plus matures sont localisés plus basalement (Figure 5D-E, vert). Pour comprendre ce mouvement vers le pôle basal au sein des jonctions septées dans un premier temps et déterminer s'il s'agit d'un processus actif ou passif, je me suis intéressée à l'assemblage des jonctions septées à la nouvelle interface entre les cellules sœurs.

Les tissus mosaïques décrit précédemment permettent d'observer la division de cellules exprimant ATP α ::YFP et dont les cellules voisines n'expriment pas ATP α ::YFP. Dans cette configuration, la seule source de ATP α ::YFP est la cellule en division. L'observation de cette nouvelle configuration m'a permis de mettre en évidence le recrutement de ATP α ::YFP au-dessus du midbody au fur et à mesure que celui-ci progresse vers le pôle basal des cellules (Figure 5F-G et S4A). 10 minutes après la transition anaphase, la forme d'haltère est observable au niveau du midbody (Figure 5F', t=10min). En revanche, la nouvelle interface n'est pas formée (Figure 5F, t=10min). Mais 30 minutes plus tard, alors que le midbody amorce sa migration vers le pôle basal, 2 μ m au-dessus, la nouvelle jonction bicellulaire commence à s'assembler (Figure 5F, t=50min). Alors que de nouvelles jonctions bicellulaires se forment en apical du midbody, en basal du midbody, aucun marquage ATP α ::YFP n'est détecté (Figure 5G). L'assemblage des jonctions septées bicellulaires à la nouvelle interface entre les cellules sœurs a donc lieu au-dessus du midbody.

3.2.3 Des jonctions tri-cellulaires se forment à proximité du midbody.

Lors de la formation de la nouvelle interface entre les cellules sœurs, le remodelage des membranes amène à la formation de nouvelles jonctions tri-cellulaires de part et d'autre de la nouvelle interface (Figure 6A). Celles-ci se mettent en place à l'interface entre trois cellules, les deux cellules sœurs et la cellule voisine. Peu de choses sont connues quant à la mise en place des jonctions tri-cellulaires au cours de la cytodivision des cellules épithéliales. Pour observer les jonctions tri-cellulaires, j'avais à ma disposition deux marqueurs spécifiques de ces jonctions, Gli::YFP et Bark::GFP. Dans un premier temps, j'ai suivi la distribution de Gli::YFP lors de la division de cellules exprimant également MyoII::RFP (Figure 6B-C). A l'inverse de ATP α ::YFP qui est recruté de manière uniforme le long de la nouvelle interface (Figure 5F), Gli::YFP est recruté sous forme de points 26 minutes (+/- 4min, n=11) après la transition anaphase, d'abord près du midbody (Figure 6B', t=23min, flèche jaune) puis de proche en proche (t=33 et t=38min) jusqu'à former une sorte de collier de perle de part et d'autre du midbody, le long de la nouvelle interface (Figure 6B' et 6C, t=1h23). A cet endroit, nous avons bien trois cellules impliquées : les deux cellules sœurs et la cellule voisine dont la protrusion en forme de doigt contacte toujours le midbody. La structure en collier de perle est maintenue tout au long de la migration du midbody. A t=2h23, elle commence à être désassemblée (Figure 6B', C), ce qui correspond au moment où le midbody (flèches rouges) accélère sa migration vers le pôle basal de la cellule et quitte la strate des jonctions septées (Figure 6C, entre t=2h23 et t=2h33). Enfin, en parallèle, à partir de t=1h23, Gli::YFP s'accumule aux nouvelles jonctions tri-cellulaires formées de part et d'autre de la nouvelle interface, juste sous les jonctions adhérentes, marquées par MyoII::RFP (Figure 6B, flèche rouge). De manière intéressante, des expériences préliminaires de FRAP, réalisées sur les points de Gli::YFP tout juste formés à proximité du midbody (Figure 6D, t=30min et t=35min), montrent une absence de recouvrement de fluorescence (Figure 6D, t=1h10). Ces résultats préliminaires

indiqueraient que les jonctions tri-cellulaires néoformées en apical du midbody sont stables jusqu'à leur désassemblage juste avant que le midbody ne quitte la strate des jonctions septées. Enfin, Bark, connu pour recruter Gli aux jonctions tri-cellulaires, présente une cinétique d'apparition similaire à Gli (Figure S4B-B'). Le premier point de Bark::GFP apparaît 20 minutes (+/-4min, n=8) après la transition anaphase (Figure S4B, flèche jaune), à proximité du midbody (Figure S4B', flèches rouges). Ces expériences mettent en évidence la formation de jonctions tri-cellulaires juste en apical du midbody, le long de la nouvelle interface entre les cellules sœurs.

Nos observations montrent que la formation des jonctions bicellulaires et tri-cellulaires est un processus lent, prenant plus de 1h30. Nous savons également que la première phase de migration du midbody au sein des jonctions septées est plus lente que lorsque le midbody quitte la strate des jonctions septées. Existe-t-il une corrélation entre la vitesse de migration du midbody et l'assemblage des jonctions septées ?

3.2.4 L'assemblage des jonctions septées a lieu sous les jonctions adhérentes.

Afin de mieux comprendre le processus d'assemblage des jonctions septées à la nouvelle interface, nous avons réalisé des expériences FRAP à la fois sur les membranes de cellules en interphase et sur la nouvelle interface formée entre les cellules sœurs. En 2011, Oshima et Fehon mettaient en évidence une vitesse de renouvellement des jonctions septées de l'ordre de 30 minutes à 1h, dans l'embryon de Drosophile. Ce renouvellement lent des jonctions septées permet-il d'expliquer nos observations ?

Dans un tissu exprimant à la fois ATP α ::YFP et MyoII::RFP, nous avons photoblanchi (PB = Photoblanchiment), 20 minutes après la transition anaphase, l'un des doigts formés autour du midbody (Figure 7A-A'). Le second doigt est utilisé comme contrôle. Un kymographe généré dans le plan du midbody permet de

constater de manière surprenante que nous n'observons pas, ou peu, de recouvrement de fluorescence dans la zone photo-blanchie (Figure 7D'). En revanche, un kymographe généré dans un plan situé $1\mu\text{m}$ sous les jonctions adhérentes, marquées par MyoII::RFP, permet de constater un début de recouvrement environ 30 minutes après le photoblanchiment (Figure 7D). Les données sont quantifiées à partir des kymographes et présentées Figure 7G (n=8). De manière très intéressante, les expériences similaires réalisées à l'interface de cellules en interphase (Figure 7B,B') mettent en évidence un retour de la fluorescence d'abord $1\mu\text{m}$ sous les jonctions adhérentes (Figure 7E), puis $2\mu\text{m}$ sous les jonctions adhérentes (Figure 7E',H, n=6). L'assemblage des jonctions bicellulaires s'effectue donc sous les jonctions adhérentes puis les jonctions néoformées se déplacent progressivement vers le pôle basal laissant la place à l'assemblage de nouvelles jonctions en apical. Les expériences de FRAP menées sur Bark::GFP (Figure 7C,C') et Gli::YFP (Figure S5A,A') ont permis de constater que les jonctions tri-cellulaires présentent les mêmes caractéristiques d'assemblage. Après photoblanchiment, Bark::GFP est détecté d'abord sous les jonctions adhérentes (Figure 7F) puis progressivement vers le pôle basal (Figure 7F',I, n=4). De même, Gli::YFP apparaît $1\mu\text{m}$ sous les jonctions adhérentes (Figure S5B) avant d'apparaître plus basalement (Figure S5B', n=9). Une coupe orthogonale coupant la jonction photo-blanchie et une jonction contrôle permet de visualiser le recouvrement de fluorescence selon l'axe apico-basal (Figure S5C). Les kymographes générées sur ces deux jonctions à partir de la coupe orthogonale permet de mettre clairement en évidence l'orientation apico-basale de l'assemblage des jonctions (Figure SD,D'). En effet, le recouvrement débute sous les jonctions adhérentes, matérialisées par MyoII::RFP, 30 minutes après le photoblanchiment (Figure S5D') puis se propage vers le pôle basal jusqu'à recouvrement de toute la hauteur de jonctions septées visible sur la jonction contrôle (Figure S5D). Enfin, la cinétique de recouvrement des différents composants de jonctions septées est similaire entre les cellules en interphase et les cellules en division, ce qui laisse penser à un

phénomène intrinsèque à l'ensemble de tissu, une sorte de tapis roulant membranaire, orienté du pôle apical vers le pôle basal.

Tout comme la vitesse de migration du midbody est influencée par la température, nous sommes actuellement en train de tester si c'est également le cas pour la vitesse d'assemblage des jonctions septées. Ce point pourrait constituer une première démonstration que la migration du midbody vers le pôle basal est un phénomène passif, dicté par l'assemblage des jonctions septées en apical du midbody.

3.2.5 Corrélation entre l'assemblage des jonctions septées et la vitesse de migration du midbody.

Afin de tester l'éventuel lien entre l'assemblage des jonctions septées et la vitesse de migration du midbody, nous observons la cinétique du midbody dans des cellules dont les jonctions septées sont affectées. Pour ces expériences, nous générons des tissus mosaïques présentant des îlots de cellules mutantes *bark^{L200}* ou *Gli^{div3}*. Dans le contexte *bark^{L200}*, les jonctions bicellulaires et tricellulaires sont affectées (Figure 8A-C'). Dans les cellules mutantes *bark^{L200}*, Gli est totalement absent des jonctions tri-cellulaires (Figure 8C,C'). Les marquages Dlg et Fas3 montrent un épaissement de la strate des jonctions septées (Figures A',B') et la formation de protrusions membranaires (Figure 8A,B, flèches rouges). Les jonctions adhérentes, marquées par E-Cad, ne sont pas affectées dans ces cellules mutantes. L'imagerie en temps réel des îlots de cellules mutantes *bark^{L200}* exprimant ATPα::YFP montre également la présence de protrusions de membrane (données non présentées), témoignant de la désorganisation des jonctions septées. Dans ce contexte où les jonctions septées sont en partie désorganisées et plus étendues le long de la membrane latérale, nous mesurons la cinétique de migration du midbody. Les résultats obtenus montrent que la première phase de migration du midbody, dans la strate des jonctions septées, est plus rapide dans le cas des cellules *bark^{L200}* (Figure

8D). De la même manière, l'analyse des îlots de cellules mutantes *Gli^{div3}* montre que les jonctions bicellulaires sont affectées, le marquage Fas3 est plus diffus (Figure 8E,E') et des protrusions membranaires sont également visibles (Figure 8E, flèche rouge). L'imagerie en temps réel de ces cellules en division met en évidence une accélération de la première phase de migration du midbody. Toutefois, contrairement au contexte *bark^{L200}*, la courbe de migration du midbody marque un plateau à un niveau pouvant correspondre à la limite basale de la strate des jonctions septées (Figure 8F). D'après la littérature, les jonctions tri-cellulaires ne sont pas affectées et Bark est recrutée en absence de Gli (Byri et al., 2015). Des expériences supplémentaires permettraient de comprendre si les jonctions tri-cellulaires formées en apical du midbody peuvent être à l'origine de cet arrêt dans la migration du midbody des cellules mutantes *Gli^{div3}*.

Pour comprendre si la vitesse d'assemblage des nouvelles jonctions septées influence la vitesse de migration du midbody, nous avons réalisées des expériences de FRAP de ATP α ::YFP dans des cellules mutantes pour *bark^{L200}*. Nous obtenons des résultats comparables à ceux obtenus dans un contexte sauvage (données non présentées). La vitesse d'assemblage des jonctions septées n'est donc pas affectée malgré qu'elles apparaissent désorganisées.

Le modèle proposé à l'issu de ces travaux est le suivant. Dans un contexte sauvage, l'organisation des jonctions septées et les contacts maintenus avec les cellules voisines sont un frein à la migration du midbody vers le pôle basal. Seul l'assemblage *de novo* de jonctions septées en apical du midbody permet une migration lente. Une fois quitté la strate des jonctions septées, la résistance appliquée par ces dernières n'est plus et la migration du midbody vers le pôle basal est accélérée. En conclusion, le maintien des contacts avec les cellules voisines et l'assemblage orienté des jonctions septées en apical du midbody sont des facteurs permettant de conserver l'intégrité du tissu au cours de la division des cellules épithéliales.

Figure 4

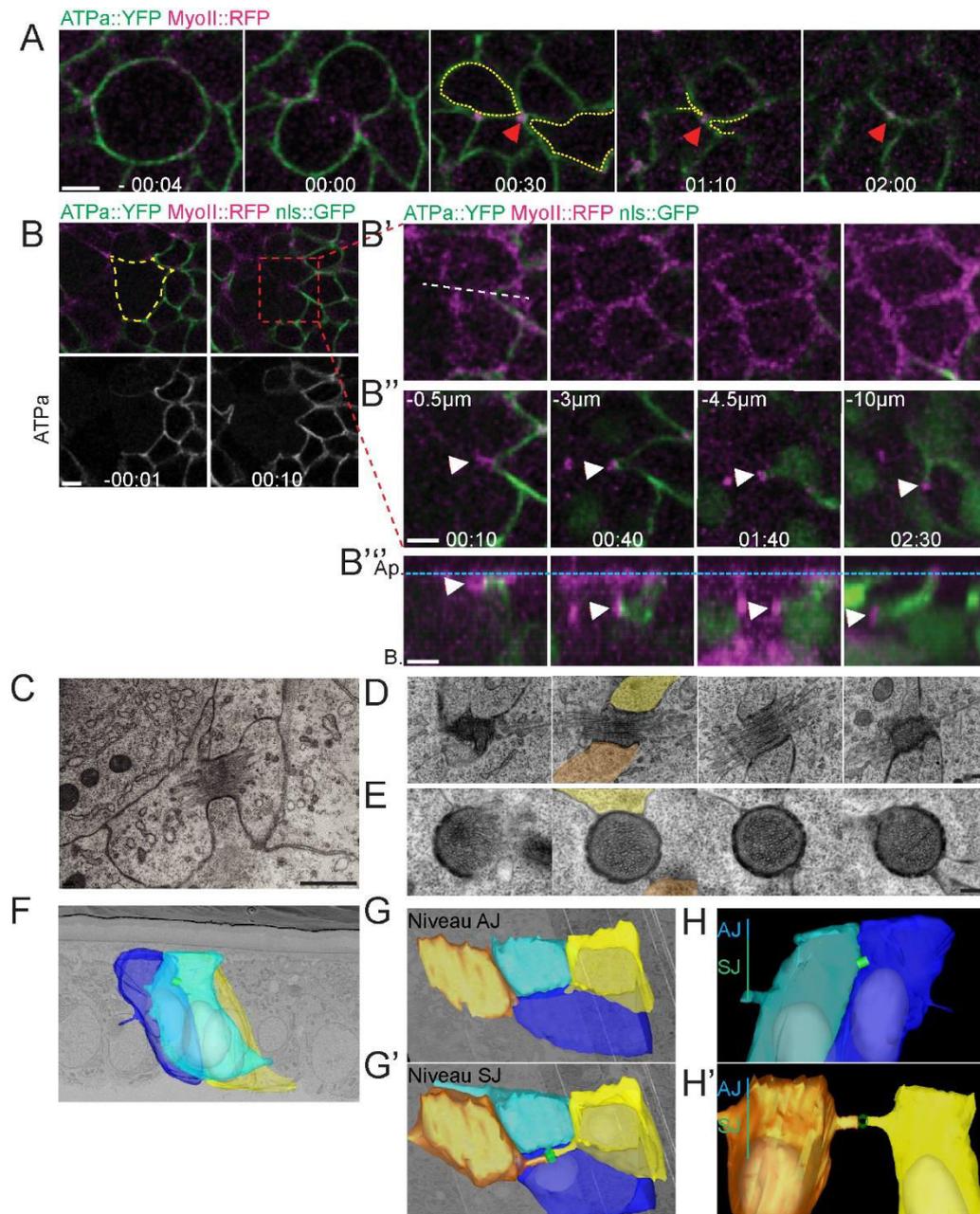


Figure 5

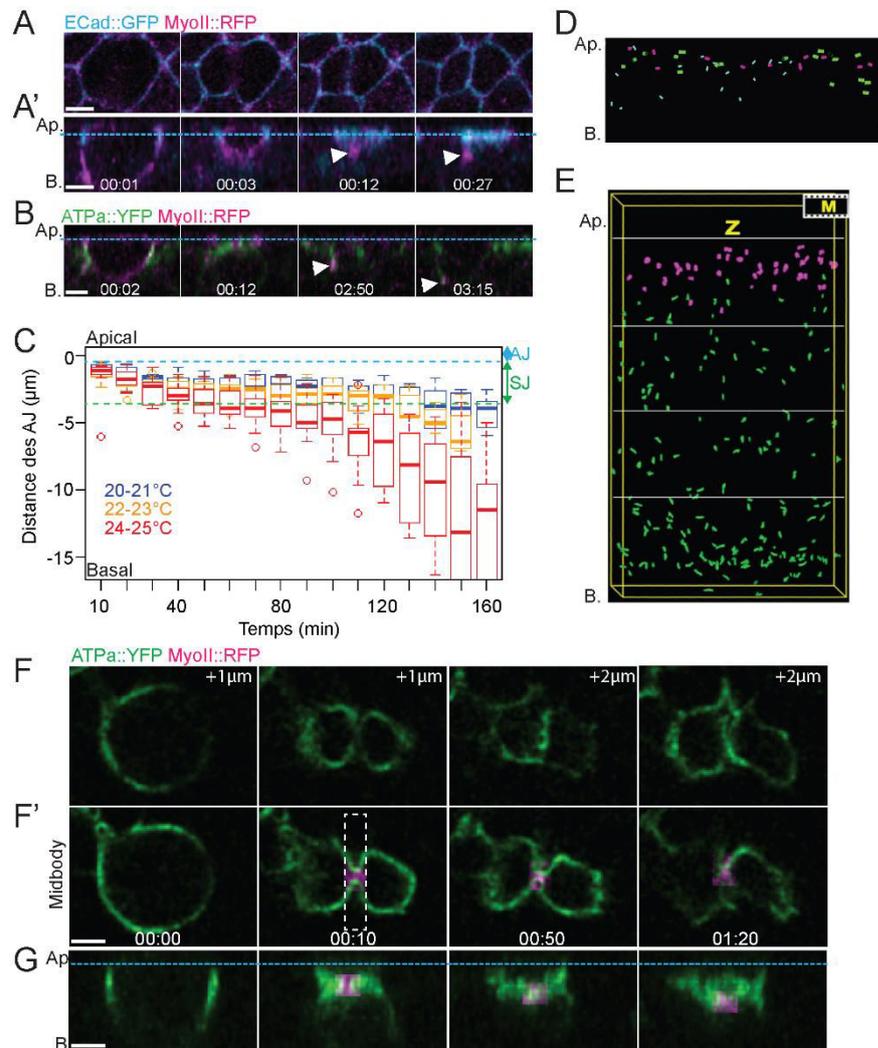


Figure 6

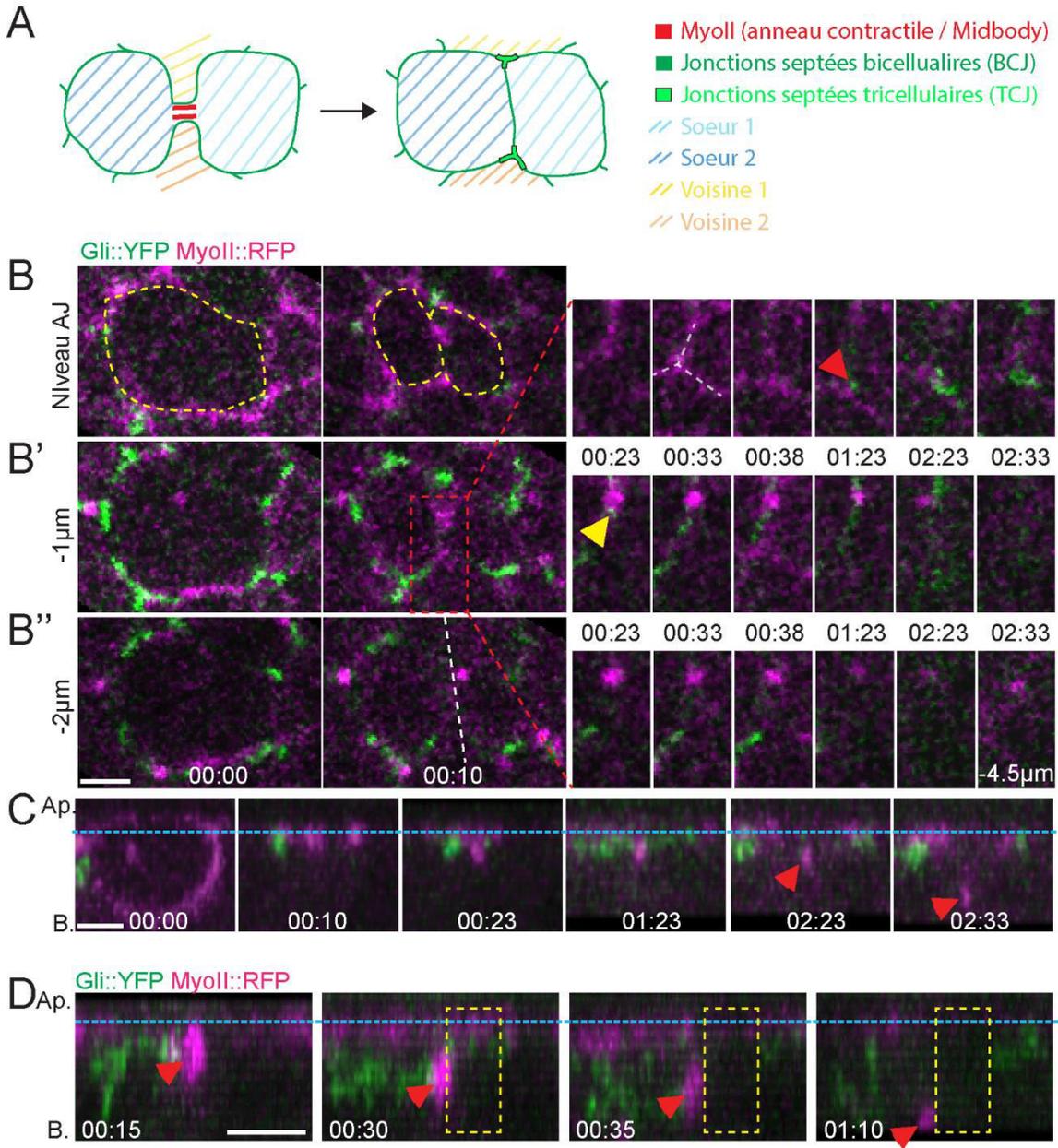


Figure 7

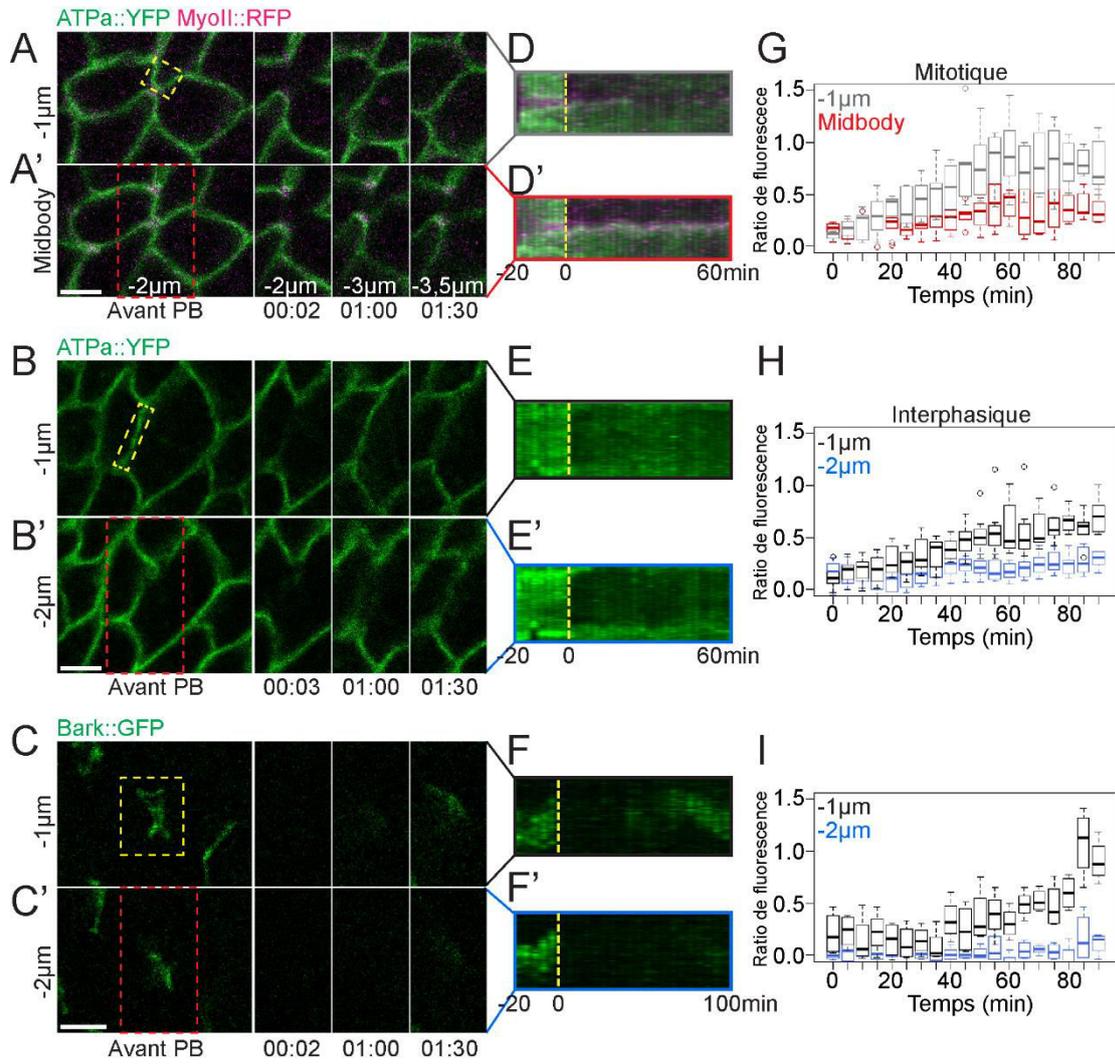


Figure 8

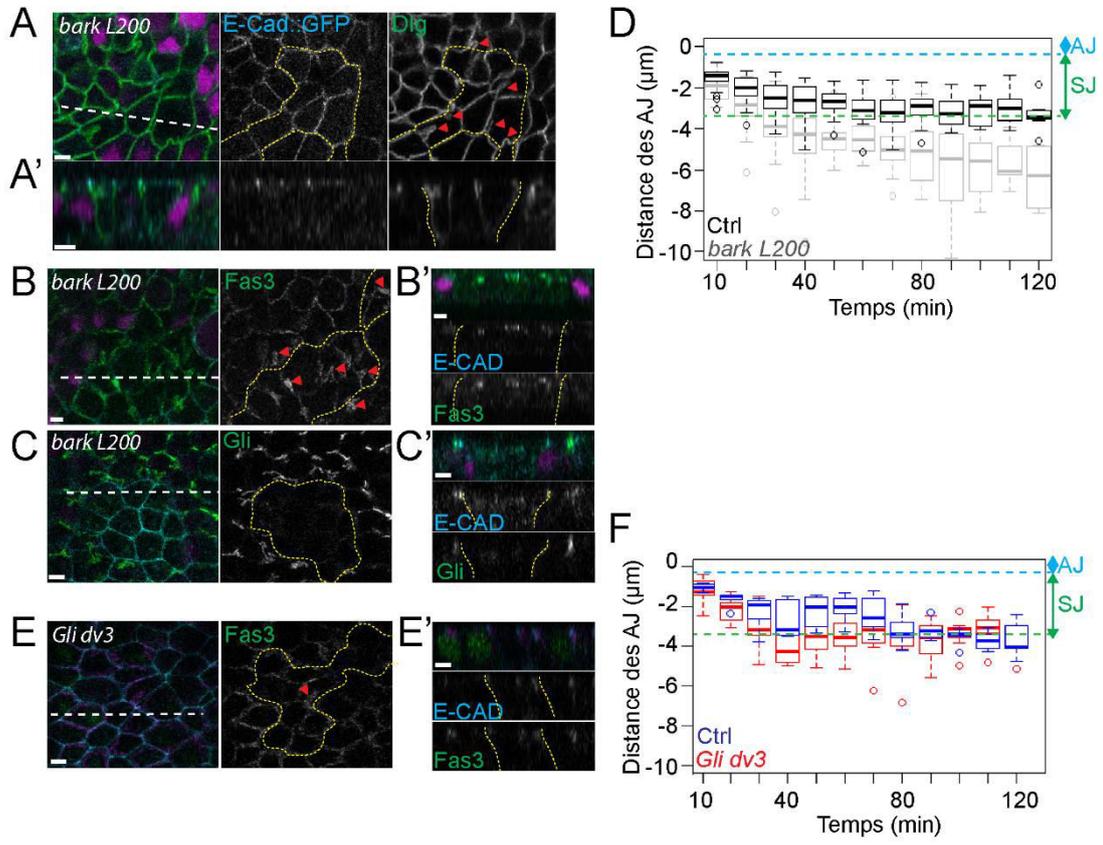


Figure S3

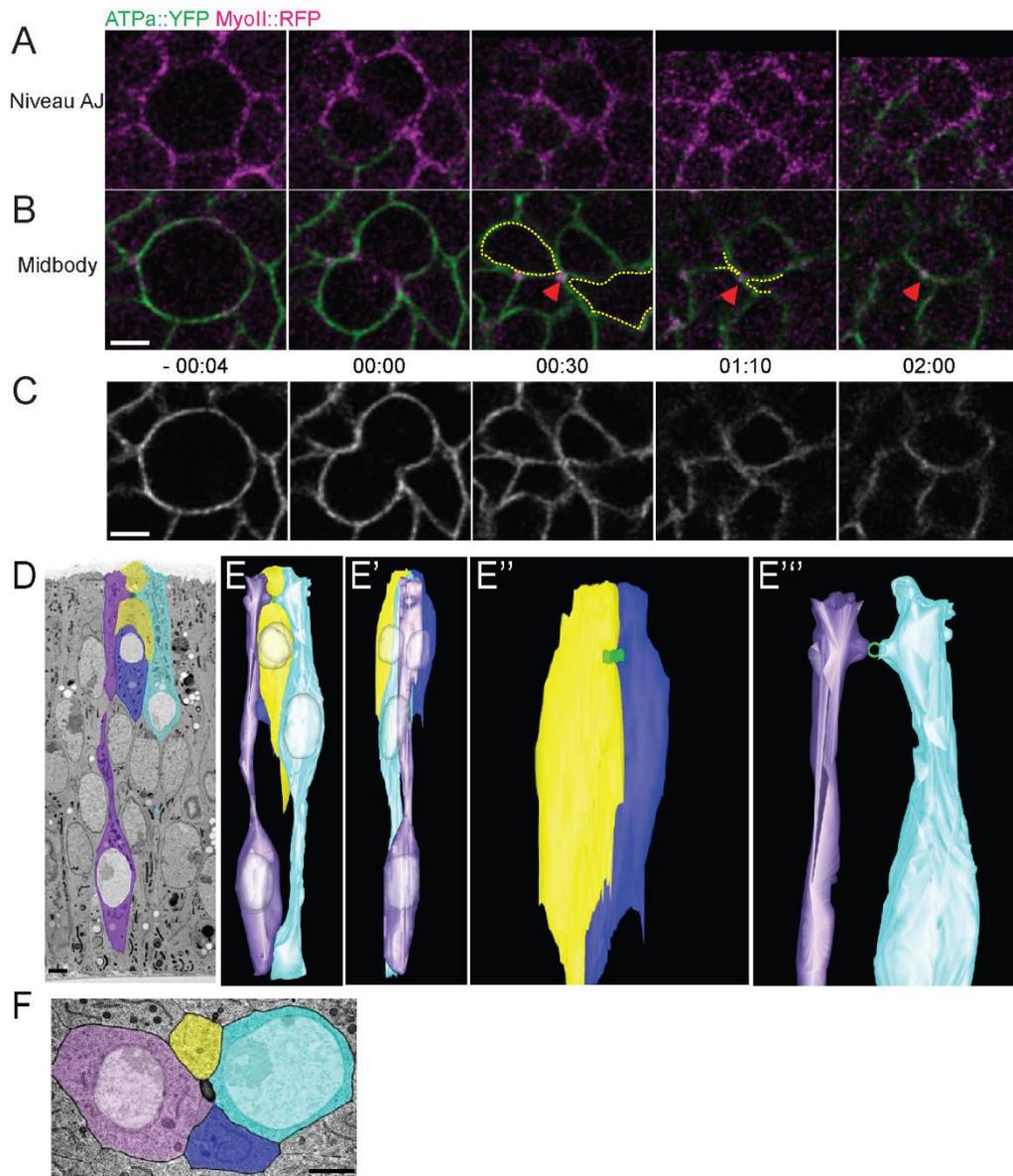


Figure S4

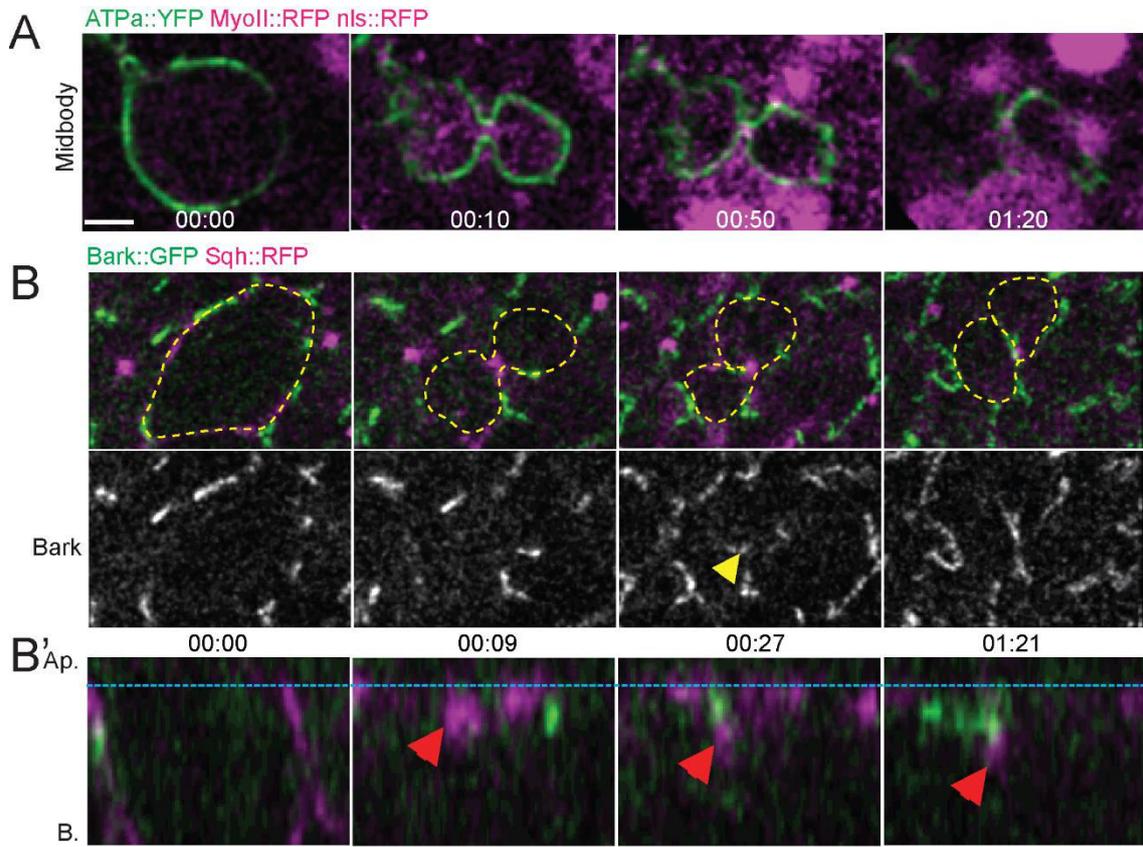
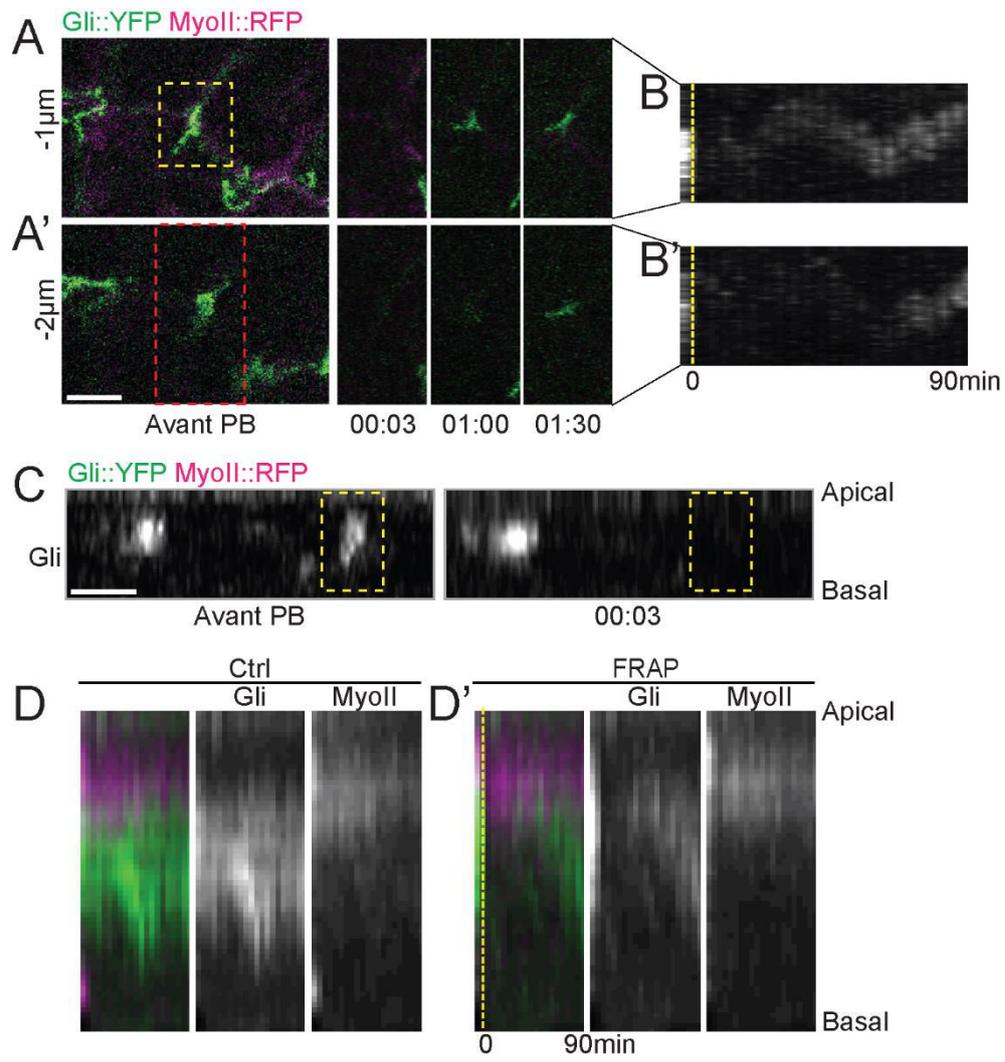


Figure S5



Légendes des figures

Figure 4 : Les cellules épithéliales en division restent connectées à leurs voisines.

(A) Imagerie confocale en temps réel d'une cellule en division exprimant simultanément ATP α ::YFP (vert) et MyoII::RFP (magenta). Les cellules voisines et, notamment leur contact avec le midbody (flèches rouges), sont délimitées par des pointillés jaunes.

(B,B''') Imagerie confocale en temps réel d'un îlot de cellule exprimant MyoII::RFP (magenta) à proximité de cellules exprimant MyoII::RFP et ATP α ::YFP (vert). Une cellule exprimant ATP α endogène et non marqué (ligne pointillée jaune) se divise à côté d'une cellule exprimant ATP α ::YFP. (B'-B''') Fort grossissement de la cellule en division présentée en (B). (B',B'') sont des vues parallèles au plan de l'épithélium dans le plan des jonctions adhérentes, marquées par MyoII::RFP (B'), ou dans le plan du midbody (B''). (B''') est une vue orthogonale au plan de l'épithélium (projection maximale de 1.5 μ m) passant par le midbody et les prolongements en forme de doigt des cellules voisines (ligne pointillée blanche en B'). La ligne pointillée bleue matérialise le niveau des jonctions adhérentes.

(C-E) Images de microscopie électronique à transmission d'une cellule en division coupée parallèlement au midbody (C) et sections sériées parallèles (D) ou orthogonales (E) à l'axe du midbody. Les prolongements des cellules voisines en contact avec le midbody sont surlignés en jaune et or.

(F-H') Modélisation 3D basée sur des données de SFB-SEM illustrant les contacts membranaires entre les cellules sœurs (bleu et cyan) et leurs voisines (jaune et or). (G,G') Au niveau des jonctions adhérentes (AJ), la longue interface entre les cellules sœurs est formée (G), tandis qu'au niveau du midbody (vert), les cellules voisines sont toujours en contact avec le midbody (G'). (H,H') Vues orthogonales des cellules sœurs toujours connectées par le midbody (H) et des

cellules voisines avec les prolongements en forme de doigt au contact du midbody (H').

Le temps est en h:min en A-B'''. Barre d'échelle : 3µm en A-B''', 2µm en C et 200nm en D,E.

Figure 5 : Les nouvelles jonctions septées se forment en apical du midbody.

(A-B) Imagerie confocale en temps réel de cellules en division exprimant MyoII::RFP (magenta) et E-Cad::GFP (cyan en A,A') ou ATPα::YFP (vert en B).

(A) Vue parallèle au plan de l'épithélium au niveau des jonctions adhérentes.

(A',B) Sections orthogonales (projection maximale de 2.4µm) au plan de l'épithélium et parallèles à l'anneau contractile puis au midbody (flèches blanches). La ligne bleue matérialise le niveau des jonctions adhérentes.

(C) Graphes représentant la distance du midbody par rapport aux jonctions adhérentes (ligne bleue) au cours de temps après la transition anaphase, à 20-21°C (bleu, n=10), à 22-23°C (jaune, n=12) et à 24-25°C (rouge, n=19). La limite basale des jonctions septées est matérialisée par la ligne verte.

(D,E) Projections maximales de vues orthogonales montrant la distribution apico-basale des midbody (magenta) et des ponts intercellulaires matures (vert) identifiés sur des reconstructions 3D obtenus par SFB-SEM du thorax dorsal (D) ou du disque imaginal d'aile (E).

(F-G) Imagerie confocale en temps réel d'une cellule en division exprimant ATPα::YFP (vert) et MyoII::RFP (magenta) et entourée de cellules n'exprimant pas ATPα::YFP et exprimant le marqueur de clone nls-RFP (seul le signal correspondant au signal MyoII::RFP est extrait et montré en F',G (voir figure S4A pour les données originales incluant le signal nls-RFP)). (F,F') Sections parallèles au plan de l'épithélium, situées 1µm sous les jonctions adhérentes (F) ou dans le plan du midbody (F'). (G) Section orthogonale au plan de l'épithélium incluant

le midbody (projection maximale de 1.5 μ m correspondant au rectangle blanc en F'). La ligne bleue matérialise le niveau des jonctions adhérentes.

Le temps est en h:min en A-B et F-G, en min en C. Barre d'échelle : 3 μ m.

Figure 6 : Des jonctions tri-cellulaires stables se forment transitoirement en apical du midbody.

(A) Représentation schématique d'une cellule épithéliale en division. Les cellules sœurs (bleu clair et bleu foncé) sont connectées par le midbody (rouge), auquel sont également connectées les cellules voisines (jaune et or). Cette conformation à quatre cellules évolue et de nouvelles jonctions bicellulaires (vert foncé) se forment à l'interface entre les cellules sœurs. Deux nouvelles jonctions tri-cellulaires (vert clair) se forment de part et d'autre de cette nouvelle interface.

(B-D) Imagerie confocale en temps réel de cellules en division (lignes pointillées jaunes) exprimant Gli::YFP (vert) et MyoII::RFP (magenta). (B-B'') Sections parallèles au plan de l'épithélium, situées au niveau des jonctions adhérentes (AJ) (B), 1 μ m (B') et 2 μ m ou 4.5 μ m (B'') sous les jonctions adhérentes. A partir de t=23min, seule l'image au niveau du midbody et correspondant au rectangle rouge matérialisé à t=10min, est présenté. (C) Section orthogonale (projection maximale de 1,2 μ m) de la nouvelle interface entre les cellules sœurs connectées par le midbody (flèche rouges) et présentées en B-B'' (ligne pointillée blanche en B''). Gli::YFP est recrutée à proximité du midbody (flèche jaune en B') et s'enrichie également aux nouvelles jonctions tri-cellulaires de part et d'autre de la nouvelle interface (flèche rouge en B). (D) Section orthogonale dans le plan du midbody. Le signal Gli::YFP apparu à proximité du midbody (flèches rouges) est photo-blanchi (rectangle jaune) à t=30min. Les lignes bleues matérialisent la position des jonctions adhérentes.

Le temps est en h:min. Barre d'échelle : 3 μ m.

Figure 7 : Les nouvelles jonctions septées se forment sous les jonctions adhérentes.

(A-C') Imagerie confocale en temps réel et photoblanchiment (PB) de cellules en division (A,A') ou de cellules interphasiques (B,C') exprimant MyoII::RFP (magenta en A,A', non montré en B-C') et ATP α ::YFP (vert en A-B') ou Bark::GFP (vert en C,C'). La zone d'intérêt matérialisée par les pointillés jaunes est photoblanchie à t=0 et le recouvrement de fluorescence est analysé. (A-C) Sections parallèles au plan de l'épithélium et situées 1 μ m sous les jonctions adhérentes (A,B,C), dans le plan du midbody (A') ou 2 μ m sous les jonctions adhérentes (B',C'). La zone matérialisée par les pointillés rouges sur les images avant photoblanchiment est montrée pour les images après photoblanchiment.

(D-F') Kymographes de ATP α ::YFP (vert en D-E'), Bark::GFP (vert en F,F') et MyoII::RFP (magenta en D,D') correspondant aux cellules présentées en (A-C'). La ligne pointillée jaune correspond au temps de photoblanchiment.

(G-I) Graphes de quantification du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment de ATP α ::YFP (G,H) et Bark::GFP (I). Les courbes noires correspondent au recouvrement 1 μ m sous les jonctions adhérentes, alors que les courbes rouge (G) et bleues (H,I) correspondent, respectivement, au recouvrement au niveau du midbody ou 2 μ m sous les jonctions adhérentes (n=8 (G), n=6 (H), n=4 (I)).

Le temps est en h:min en A-C' et en min en D-I. Barre d'échelle : 3 μ m.

Figure 8 : L'assemblage des jonctions septées régule la vitesse de migration du midbody.

(A-C') Immunomarquage de E-Cad (bleu), Dlg (vert en A), Fas3 (vert en B) et Gli (vert en C) sur des tissus présentant des îlots de cellules mutantes *bark*^{L200} (délimités par les lignes pointillées jaunes) repérés par la perte du marqueur nls-GFP (magenta). (A,B,C) Sections parallèles au plan de l'épithélium. (A',B',C')

Sections orthogonales au plan de l'épithélium, obtenues le long de la ligne pointillée blanche matérialisée en (A,B,C).

(D) Graphes représentant la distance du midbody par rapport aux jonctions adhérentes (ligne bleue) au cours de temps après la transition anaphase dans des cellules sauvages (noir, n=22) et des cellules mutantes *bark^{L200}* (gris, n=22).

(E,E')) Immunomarquage de E-Cad (bleu) et Fas3 (vert) sur des tissus présentant des îlots de cellules mutantes *gli^{dv3}* (délimités par les lignes pointillées jaunes) repérés par la perte du marqueur nls-GFP (magenta). (E) Section parallèle au plan de l'épithélium. (E') Section orthogonale au plan de l'épithélium, obtenue le long de la ligne pointillée blanche matérialisée en (E).

(F) Graphes représentant la distance du midbody par rapport aux jonctions adhérentes (ligne bleue) au cours de temps après la transition anaphase dans des cellules sauvages (bleu, n=5) et des cellules mutantes *gli^{dv3}* (rouge, n=7).

Le temps est en min en D,F. Barre d'échelle : 3µm.

Figure S3 (relative à la figure 4) : La division des cellules épithéliales implique quatre cellules.

(A) Imagerie confocale en temps réel d'une cellule en division exprimant ATP α ::YFP (vert en A,B et gris en C) et MyoII::RFP (magenta). Sections parallèles au plan de l'épithélium et situées dans le plan des jonctions adhérentes (A) ou dans le plan du midbody (B,C ; le panneau B est présenté Figure 4A). Les lignes pointillées jaunes délimitent les cellules voisines restant au contact du midbody (flèches rouges).

(D-F) Modélisation 3D basée sur des données de SFB-SEM illustrant les contacts membranaires entre les cellules sœurs (bleu et jaune) et leurs cellules voisines (cyan et mauve). (E,E') Vues parallèle (E) ou orthogonale (E') au midbody. (E'') montre les cellules sœurs connectées par le midbody (vert) et (E''') montre les cellules voisines restant au contact du midbody par des prolongements en forme de doigt. (F) Vue d'avion coupant le midbody.

Le temps est en h:min en A-C. Barre d'échelle : 3 μ m en A-C, 2 μ m en D,F.

Figure S4 (relative aux figures 5 et 6) : Les jonctions septées se forment en apical du midbody.

(A) Données originales présentant les signaux MyoII::RFP et nls::RFP (magenta) d'imagerie confocale en temps réel d'une cellule en division exprimant ATP α ::YFP (vert) et MyoI::RFP (magenta), présentée en Figure 5F-G.

(B,B') Imagerie confocale en temps réel d'une cellule en division (lignes pointillées jaunes) exprimant Bark::GFP (vert) et MyoII::RFP (magenta). (B) Section parallèle au plan de l'épithélium et dans le plan du midbody, montrant le recrutement de Bark::GFP à proximité du midbody (flèche jaune). (B') Section orthogonale des panneaux (B) dans le plan du midbody (flèches rouges). La ligne bleue matérialise la position des jonctions adhérentes.

Le temps est en h:min. Barre d'échelle : 3 μ m.

Figure S5 : Les jonctions tri-cellulaires se forment sous les jonctions adhérentes.

(A,D') Imagerie confocale en temps réel et photoblanchiment (PB) de cellules en interphasiques exprimant MyoII::RFP (magenta) et Gli::YFP (vert). La zone d'intérêt matérialisée par les pointillés jaunes est photo-blanchie à $t=0$ et le recouvrement de fluorescence est analysé. Sections parallèles au plan de l'épithélium et situées $1\mu\text{m}$ sous les jonctions adhérentes (A) ou $2\mu\text{m}$ sous les jonctions adhérentes (A'). La zone matérialisée par les pointillées rouges sur les images avant photoblanchiment est montrée pour les images après photoblanchiment.

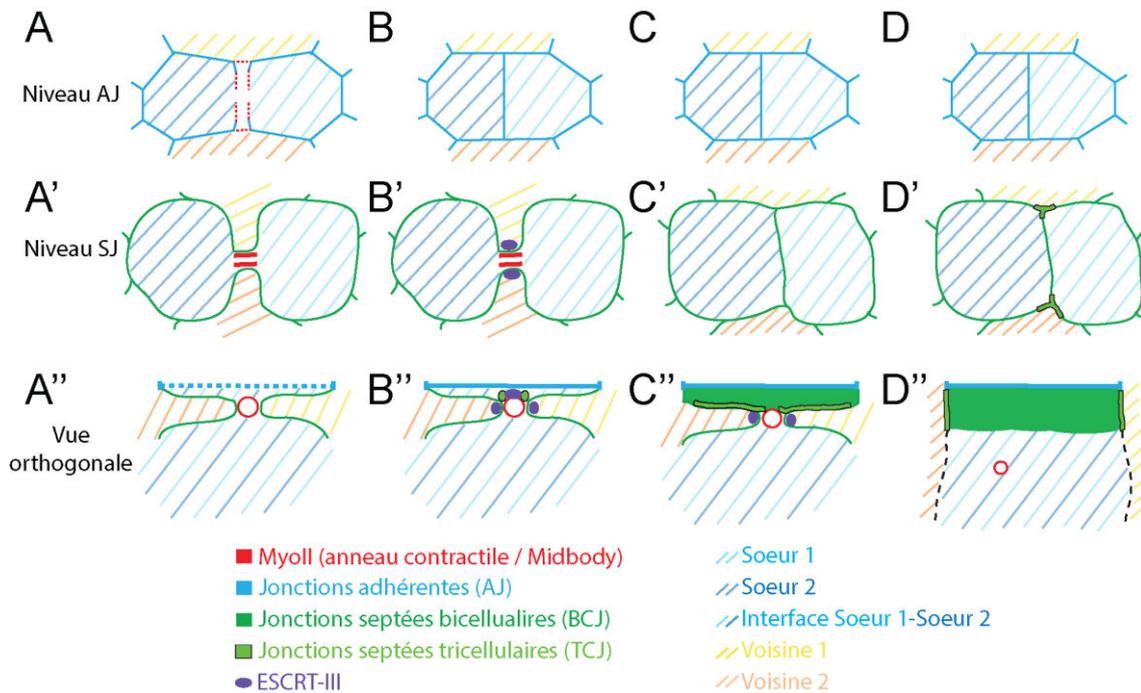
(B,B') Kymographes de Gli::YFP correspondant à la cellule présentée en (A,A'). La ligne pointillée jaune correspond au temps de photoblanchiment.

(C) Section orthogonale au plan de l'épithélium avant et après photoblanchiment d'une jonction tri-cellulaire (rectangle pointillé jaune).

(D,D') kymographes Gli::YFP (vert) et MyoII::RFP (magenta) correspondant aux jonctions tri-cellulaires contrôle (D) et photo-blanchie (D'), présentées en (C). La ligne pointillée jaune correspond au temps de photoblanchiment.

Le temps est en h:min en A,A' et C et en min en B,B' et D,D'. Barre d'échelle : $3\mu\text{m}$.

III- Conclusion Générale



Une fois l'anneau contractile fermé, celui-ci donne naissance au midbody. Lors de notre étude, nous avons montré que la chronologie d'apparition et de disparition des différents marqueurs au niveau du midbody était semblable entre la cytotérièse des cellules épithéliales et la cytotérièse des cellules isolées, décrites précédemment. Le midbody se forme juste sous les jonctions adhérentes, dans la strate des jonctions septées (A''). Au niveau des jonctions adhérentes, la longue interface entre les cellules sœurs (bleues) est rapidement formée une fois l'anneau contractile fermé (A-D). Dans la strate des jonctions septées, les cellules voisines (jaune et or) présentent des protrusions de membranes en forme de doigt qui maintiennent le contact avec le midbody (A', A''). Une quinzaine de minutes après la transition anaphase, Shrb est recrutée au niveau du midbody par les cellules voisines (mauve en B', B''). Puis, quelques minutes plus tard, Shrb apparaît au-dessus du midbody, cette fois recrutée par la

cellule en division (B''). Dans le même temps, les premières jonctions tri-cellulaires (vert clair) se forment, de manière ponctiforme, de part et d'autre et en apical du midbody (B''). Au fur et à mesure de sa maturation, le midbody amorce une lente migration vers le pôle basal de la cellule. Les jonctions tri-cellulaires, d'abord ponctiformes, forment maintenant une structure linéaire le long de l'interface entre les cellules sœurs (C''). Simultanément, de nouvelles jonctions bicellulaires (vert foncé) se forment à la nouvelle interface entre les cellules sœurs, en-dessous des jonctions adhérentes (C') et au-dessus du midbody (C''). L'assemblage des jonctions septées en apical, puis leur progression vers le pôle basal, entraîne le déplacement du midbody et des protrusions de cellules voisines vers le pôle basal. Une fois la strate des jonctions septées totalement formée entre les cellules voisines, les jonctions tri-cellulaires présentes au-dessus du midbody se désassemblent et la migration du midbody vers le pôle basal s'accélère (D''). Dans le même temps, de nouvelles jonctions tri-cellulaires ont pris aux extrémités de la nouvelle interface formée entre les cellules sœurs (D'). Durant la totalité de ces événements, nécessaire au maintien de l'intégrité du tissu épithélial au cours de la division cellulaire, l'abscission n'a pas lieu dans les cellules épidermales du thorax dorsal de *Drosophila*. Le cytoplasme des cellules sœurs n'est pas physiquement séparé et reste en contact *via* le pont intercellulaire.

IV- Discussion

1- L'abscission est effective lorsque les cellules épithéliales se préparent à une nouvelle division.

Lors de la division des cellules épithéliales du thorax dorsal de drosophile, et notamment des cellules épidermales, les régulateurs de l'abscission, composants du CPC, AurB et Svv, disparaissent du midbody et la protéine ESCRT-III, Shrb, est recrutée. Les cellules sont donc prêtes pour l'abscission environ 45 minutes après la transition anaphase. Les observations réalisées en microscopie électronique montrent également des ponts intercellulaires internalisés dans le compartiment intracellulaire. Toutefois, nous mettons en évidence un délai avant l'abscission dans ces cellules. Au stade où nous les observons, les cellules épidermales ne ré-entrent pas en division. Nos expériences de photo-conversion de la KAEDE, réalisées en amont des divisions observées 16 heures après la formation de la puppe, ont permis de montrer que l'abscission avait bien lieu dans ces cellules épithéliales. Nous avons ainsi pu déterminer que l'abscission avait lieu environ 70 minutes avant la division. Lors de ces expériences de photo-conversion aléatoire, j'ai pu observer des cas où la KAEDE était toujours capable de diffuser dans une et une seule cellule voisine, la cellule sœur. De manière intéressante, les deux cellules sœurs se divisent alors quasi simultanément (données non présentées). Cette observation est un argument de plus à l'idée que les cellules procèdent à l'abscission lorsqu'elles se préparent à une nouvelle division. En effet, cette division simultanée des cellules issues d'une première division est observable également dans le cas des SOPs dans lesquelles l'abscission a lieu immédiatement après le recrutement de Shrb. Environ une heure après l'abscission, les cellules filles de la SOP, pIIb puis pIIa, entrent à leur tour en division l'une immédiatement après l'autre. Dans les SOPs, Shrb::GFP est recrutée de part et d'autre du midbody, comme décrit dans les cellules isolées. Ce n'est pas le cas dans les cellules épidermales où Shrb::GFP

est recrutée au-dessus du midbody. Cette localisation de Shrb::GFP pourrait-elle expliquer que dans un cas, l'abscission a lieu immédiatement après le recrutement de Shrb, alors que dans l'autre cas, Shrb::GFP est recrutée mais l'abscission n'est pas observée plusieurs heures après ? Il serait intéressant d'observer la localisation de Shrb::GFP dans les cellules épidermales avant la division en exprimant conjointement Shrb::GFP et MyoII::RFP. Shrb::GFP serait-elle localisée de part et d'autre du midbody dans ces cellules qui se préparent à la division, comme c'est le cas dans les SOPs ? Dans cette expérience, il serait difficile de déterminer que tel midbody est issu de la division de telles cellules. De plus, à ce stade, les midbody sont localisés en profondeur dans le tissu ce qui est un obstacle à leur observation. Toutefois, si l'observation de cette configuration avec Shrb::GFP de part et d'autre du midbody, marqué par MyoII::RFP, est envisageable, elle permettrait de mettre en évidence que l'abscission dépend de la localisation précise de Shrb de part et d'autre du midbody. Ainsi, dans les cellules épidermales, Shrb est certes recrutée à proximité du midbody mais, dans un premier temps, son rôle n'est pas lié à l'abscission.

Enfin, l'ensemble de ces résultats appuie l'hypothèse selon laquelle l'abscission dans les cellules épithéliales est un évènement couplé à l'entrée en division des cellules sœurs issues d'une précédente division. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus précédemment dans les cellules HeLa et BALB/c3T3, qui montrent que l'abscission a lieu lorsque les cellules sont en phase G1 de la division suivante (Gershony et al., 2014).

2- En absence de Shrb, l'isolation cytoplasmique a bien lieu.

Dans un tissu mosaïque, les îlots de cellules se forment par divisions successives à partir d'une seule cellule initiale. Dans les îlots de cellules ayant perdu la fonction de Shrb, nous nous attendions à la formation de chaîne de cellules connectées les unes aux autres par des ponts intercellulaires non résolus,

comme c'est le cas dans les cellules germinales de drosophile (Eikenes et al., 2015). Contrairement à nos attentes, les expériences de photo-conversion ont mis en évidence l'isolation cytoplasmique des cellules dépourvues de Shrb. L'abscission pourrait donc avoir lieu en absence de ESCRT-III, suggérant ainsi l'existence d'une voie parallèle permettant la séparation cytoplasmique des cellules sœurs. Très récemment, ce phénomène a également été observé dans l'embryon de *C. elegans* où l'abscission est retardée mais bien effective en absence des ESCRTs (Konig et al., 2017). Dans cette étude, les auteurs suggèrent un nouveau rôle pour les ESCRTs dans l'élimination de la membrane plasmique durant les étapes finales de la division cellulaire, un processus déjà observé dans d'autres systèmes métazoaires (El Amine et al., 2013 ; Sherman et al., 2016). Nos données de microscopie électronique, obtenues sur des cellules dépourvues de Shrb et montrant la perte des contacts entre cellules au niveau du midbody, sont compatibles avec un rôle des ESCRTs dans le remodelage des membranes au niveau du midbody.

Dans les îlots de cellules mutantes pour *shrb^{O3}*, nous n'observons que de très rares divisions et l'ensemble des cellules mutantes finissent par délaminer et entrer en apoptose. L'isolation cytoplasmique observée dans ces cellules pourrait-elle être liée à des signaux de mort cellulaire exprimés dans la cellule ? L'hypothèse émise serait que, dès lors qu'une cellule est programmée pour mourir, elle se séparerait de sa cellule sœur. Si plusieurs études ont montré que des protéines impliquées dans la mort cellulaire jouait un rôle dans la régulation de l'abscission (Martz et al., 2013 ; Konstantinidis et al., 2015 ; Abadia-Molina et al., 2017) ou la dégradation du midbody (Chai et al., 2012), aucune évidence n'existe à ce jour infirmer ou confirmer cette hypothèse. Lors d'expériences d'ablation laser sur les cellules épithéliales du thorax dorsal, j'ai pu observer, dans certains cas, la délamination à terme de la cellule endommagée. A ce stade du développement, nous savons que l'abscission est très retardée par rapport à la transition anaphase. Une expérience originale pourrait consister à provoquer,

par le biais de l'ablation laser, la mort d'une des cellules sœurs dans un tissu exprimant la KAEDE et photo-convertir la KAEDE à différents temps après avoir endommagé la cellule. Si la KAEDE ne diffuse pas dans la cellule sœur, alors l'abscission est effective entre la cellule endommagée et sa sœur. Cette expérience pourrait être la preuve d'un lien éventuel entre l'abscission et l'entrée en apoptose des cellules épithéliales.

3- Un nouveau rôle des ESCRTs dans l'assemblage ou le maintien des jonctions septées.

Nous avons mis en évidence le recrutement de Shrb au niveau du midbody par la cellule en division, mais aussi par les cellules voisines. Dans les cellules épidermales, Shrb est recrutée au-dessus du midbody et non de part et d'autre du midbody. Cette localisation particulière dans les cellules épidermales, dont l'abscission est retardée, et dans les cellules voisines suggère un nouveau rôle de Shrb. De manière intéressante, le recrutement de Shrb au-dessus du midbody est concomitant au recrutement des composants de jonctions tri-cellulaires à ce niveau, une vingtaine de minutes après la transition anaphase. Le recrutement des composants de jonctions tri-cellulaires à ce niveau suggère que les angles formés entre les trois jonctions bicellulaires impliquées sont égaux à 120° , comme prédit par un modèle mathématique (Byri et al., 2015), pour permettre la stabilisation de Bark et Gli et l'assemblage de nouvelles jonctions tri-cellulaires. Des observations préliminaires suggèrent également un recrutement de Shrb au niveau des jonctions tri-cellulaires formées juste sous les jonctions adhérentes, aux extrémités de la nouvelle interface formée entre les cellules sœurs (données non présentées). Ces observations sont à confirmer, notamment pour corrélérer les temps de recrutement de Shrb et des composants de jonctions tri-cellulaires à ce niveau. Nous avons également montré que les cellules déplétées en Shrb présentaient des jonctions septées désorganisées et une perte de contact avec les membranes des cellules voisines au niveau du midbody est observée en microscopie électronique. La désorganisation des jonctions septées est un

phénomène également observé lors de la déplétion de Bark ou Gli. L'ensemble de ces résultats sont en accord avec un potentiel rôle de Shrb dans l'initiation de l'assemblage des jonctions tri-cellulaires. Il serait très intéressant, pour infirmer ou confirmer cette hypothèse, de visualiser l'état des jonctions tri-cellulaires en absence de Shrb, par un marquage de Gli et Bark dans les îlots de cellules mutantes *shrb*^{O3}.

4- Des jonctions tri-cellulaires stables sont assemblées au-dessus du midbody.

Les images de microscopie confocale en temps réel de cellules exprimant Bark::GFP ou Gli::YFP simultanément à MyoII::RFP ont révélé la mise en place de jonctions tri-cellulaires au-dessus du midbody. Une vingtaine de minutes après la transition anaphase, Bark puis Gli sont recrutées à proximité immédiate du midbody, d'abord sous forme de structure ponctiforme puis, de proche en proche, une structure linéaire en forme de collier de perle prend place tout le long de la nouvelle interface formée entre les cellules sœurs. Des expériences de FRAP réalisées sur ces structures ponctiformes, juste formées, ont montré une absence de recouvrement de fluorescence tout au long de la migration du midbody vers le pôle basal de la cellule. Cette absence de recouvrement témoigne de la stabilité des jonctions tri-cellulaires assemblées à ce niveau. Il serait intéressant de confirmer ces expériences dans un contexte où les jonctions tri-cellulaires déjà formées dans les voisines ne viennent pas interférer avec l'expérience. Pour cela, j'ai généré un recombinant entre Gli::YFP et FRT 40A. Ce nouveau stock permettra de visualiser des cellules en division exprimant Gli::YFP à proximité immédiate de cellules ne l'exprimant, et inversement. La contribution de chaque cellule au niveau du doigt sera notamment analysable. Dans la mesure où trois cellules sont impliquées dans la formation des jonctions tri-cellulaires, Gli::YFP devrait être recrutée dans les deux situations (cellule en division exprimant ou non Gli::YFP).

Lorsque le midbody atteint la limite basale de la strate des jonctions septées, la structure en collier de perle est désassemblée, plus aucun signaux Bark::GFP ou Gli::YFP ne sont détectables à proximité du midbody ni le long de l'interface entre les cellules sœurs. En revanche, à chaque extrémité de la nouvelle interface se forment de nouvelles jonctions tri-cellulaires entre les cellules issues de la division et la cellule voisine. Basées sur ces observations, plusieurs hypothèses sont possibles quant aux mécanismes de formation des jonctions tri-cellulaires au cours de cytodierèse. Les jonctions tri-cellulaires formées au niveau du midbody sont-elles relocalisées pour être adressées au niveau de l'extrémité de l'interface ? La formation des jonctions tri-cellulaires de proche en proche à partir du midbody est-elle nécessaire à la formation des jonctions tri-cellulaires aux extrémités de l'interface ? Enfin, les jonctions tri-cellulaires formées à l'interface entre les cellules sœurs sont-elles assemblées, stabilisées puis tout simplement désassemblées lorsque le midbody et les doigts des cellules voisines quittent la strate des jonctions septées ? Pour répondre à ces questions et trancher entre les différentes hypothèses, il pourrait être intéressant de générer une protéine Gliotactin photo-convertible. En effet, contrairement au FRAP qui éteint la fluorescence, ici, les protéines photo-converties pourraient être suivies en temps réel afin de connaître leur destinée.

5- Un ménage à quatre qui permet le maintien de l'intégrité du tissu épithélial.

A l'issue de la fermeture de l'anneau, le midbody est présent au sein des jonctions septées. L'intégrité de la barrière de perméabilité doit être maintenue malgré la présence du midbody et tout au long de sa migration vers le pôle basal. Au moment de la fermeture de l'anneau, la membrane des cellules voisines est tirée, formant ainsi une protrusion membranaire en forme de doigt qui persiste tout au long de la migration du midbody au sein de la strate des jonctions septées. Au niveau du midbody, quatre cellules sont connectées : les deux cellules issues de la division et les deux cellules voisines. Des expériences de recouvrement de

fluorescence après photoblanchiment, menées à la fois sur les composants du midbody et sur les composants de jonctions septées au niveau du doigt, ont montré une absence de recouvrement dans les deux cas. Une fois formés, les contacts entre le midbody et les cellules voisines sont extrêmement stables. La microscopie électronique permet de confirmer les contacts étroits entre les cellules en division et leurs voisines, sans qu'aucun espace ne soit visible entre les cellules. Nous avons également mis en évidence l'assemblage des nouvelles jonctions septées en apical du midbody et des protrusions de cellules voisines. Les nouvelles jonctions septées se forment au fur et à mesure que le midbody migre vers le pôle basal des cellules. L'ensemble de ces observations permet de comprendre comment la barrière de perméabilité des cellules épithéliales est maintenue tout au long de la cytodierèse. La résolution de la conformation à quatre cellules est une question encore en suspens. A quel moment les cellules voisines se désengagent et rompent-elles le contact avec le midbody ? Comment passe-t-on d'une conformation à 4 cellules, puis 2 cellules, pour finalement aboutir à l'abscission et l'internalisation du midbody par une seule cellule ? Le désengagement des cellules voisines est-il passif ou nécessite-t-il la mise en place d'un processus actif par l'une ou l'autre des cellules ? Comment évoluent les contacts entre le midbody et les cellules voisines une fois quitté la strate des jonctions septées ? Lors de mes observations d'îlots de cellules exprimant ou non ATP α ::YFP dans un tissu exprimant MyoII::RFP, j'ai pu observer à quatre reprises ce que j'explique par un désengagement d'une des cellules voisines. En effet, dans une situation bien précise, le signal ATP α ::YFP présent dans le doigt qui contacte le midbody disparaît. Ce phénomène est observé plus de 2 heures après la transition anaphase, ce qui correspond au moment où le midbody et les doigts ont quitté la strate des jonctions septées. Uniquement dans ce contexte, lorsqu'une cellule entre en division et tracte le midbody dans le sens opposé à la cellule voisine, alors le signal ATP α ::YFP présent dans le doigt disparaît. Si ce même cas de figure a lieu alors que le midbody est encore dans la strate des jonctions septées, alors la membrane de la cellule voisine est étirée mais le

contact avec le midbody perdure. Cette observation ne permet toutefois pas de conclure entre une simple dilution du signal ATP α ::YFP sur la membrane étirée ou une réelle perte de contact avec le midbody. Enfin, dans ces expériences, en dehors de ces cas précis, il est difficile de visualiser le devenir des protrusions de membrane des voisines du fait que les midbody sont à ce stade au niveau des noyaux des cellules. En effet dans ces expériences, nous utilisons des marqueurs de clones nucléaires, nls-GFP ou nls-RFP, qui interfèrent respectivement avec le marquage du midbody (MyoII::RFP) ou le marquage des jonctions (ATP α ::YFP). L'utilisation d'autres marqueurs de clones serait judicieux dans ces expériences pour mieux visualiser le devenir des protrusions de membranes une fois quitté la strate des jonctions septées.

6- La vitesse de migration du midbody est dictée par l'assemblage orienté des jonctions septées.

Après sa formation juste sous les jonctions adhérentes, le midbody amorce une lente migration vers le pôle basal de la cellule, d'abord au sein de la strate des jonctions septées, puis au sortir de celles-ci où sa migration est accélérée. Dans le même temps, les jonctions septées se mettent progressivement en place en apical du midbody. Nos expériences de recouvrement de fluorescence confirment que les jonctions septées forment un complexe stable (Oshima et Fehon, 2011). Nos expériences, menées à la fois sur des composants de jonctions bicellulaires et tri-cellulaires, montrent que l'assemblage des jonctions septées est un processus lent et polarisé. En effet, les nouvelles jonctions septées s'assemblent juste sous les jonctions adhérentes et se propagent vers le pôle basal des cellules, laissant penser à un flot continu de membrane, une sorte de tapis roulant membranaire. La cinétique d'assemblage des composants de jonctions septées est similaire dans les cellules en interphase et dans les cellules en division. Le phénomène de tapis roulant membranaire et le processus d'assemblage et de maturation des jonctions septées sont donc des propriétés intrinsèques à l'ensemble du tissu et ne dépendent pas de l'étape de la division

dans lequel se trouvent les cellules. Nous avons observé que la fermeture de l'anneau et la migration du midbody vers le pôle basal de la cellule étaient deux phénomènes dont la cinétique est influençable par la température. Est-ce le cas également pour l'assemblage des jonctions septées ? La réponse à cette question serait un argument supplémentaire à la corrélation entre la vitesse de migration du midbody et la vitesse d'assemblage des jonctions septées au-dessus du midbody. Pour y répondre, nous sommes actuellement en train de réaliser de nouvelles expériences de FRAP à 20°C et 25°C afin de comparer la cinétique de recouvrement de fluorescence dans ces deux conditions. La sensibilité de la mesure de recouvrement pourrait être un obstacle à cette comparaison si les différences à observer sont minimales.

7- La désorganisation des jonctions septées affecte la vitesse de migration du midbody.

En générant des îlots de cellules mutantes déplétées en Bark ou Gli, nous avons noté la désorganisation des jonctions septées. Celles-ci apparaissent plus diffuses et des protrusions excédentaires de membranes sont visibles. Dans ces deux contextes, la migration du midbody vers le pôle basal est plus rapide en comparaison aux cas contrôles obtenus dans les cellules sauvages présentes sur les mêmes tissus que les cellules mutantes. Par ce biais, nous sommes sûrs de nous affranchir des variations dues à la température d'acquisition des données. En absence de Bark, la migration du midbody est plus rapide et linéaire vers le pôle basal. En revanche, en absence de Gli, la migration du midbody, qui est plus rapide dans un premier temps et est comparable à la situation mutante *bark^{L200}*, marque soudainement un plateau à un niveau pouvant correspondre à la limite inférieure de la strate des jonctions septées. Nous savons que la déplétion de Bark entraîne la délocalisation de Gli et l'absence de jonctions tri-cellulaires. En revanche, l'inverse n'est pas vrai. En absence de Gli, Bark est recrutée et permet la formation des jonctions tri-cellulaires. L'absence de Gli affecte seulement les jonctions bicellulaires. Cette différence majeure permet-

elle d'expliquer le plateau observé dans la situation mutante *gli^{dv3}*? Dans ce contexte, la migration plus rapide du midbody est dans un premier temps explicable par la désorganisation des jonctions septées. Le plateau serait quant à lui dû à la présence de jonctions tri-cellulaires au-dessus du midbody, le long de l'interface entre les cellules sœurs. Pour vérifier leur présence à ce niveau dans les cellules mutantes *gli^{dv3}* en division, un marquage de Bark serait nécessaire. Si cette hypothèse est vraie, alors la déplétion de composants de jonctions bicellulaires, dans lesquels les jonctions septées sont désorganisées mais les jonctions tri-cellulaires intactes, devrait aboutir à l'obtention d'un profil de migration du midbody similaire à celui observé dans le contexte *gli^{dv3}*. Pour répondre à ce point, nous analysons actuellement la migration du midbody dans un contexte mutant *nrv2^{k13315}*. Nous envisageons également d'investiguer l'effet de la déplétion de Coracle par RNAi.

Enfin, pour déterminer l'impact de ces déplétions sur l'assemblage des jonctions septées, nous avons procédé à des expériences de FRAP sur ATP α ::YFP dans les cellules mutantes en interphase. Les résultats n'ont montré aucune différence significative en comparaison de la situation contrôle. La vitesse d'assemblage des jonctions septées ne serait donc pas affectée dans ces mutants. La migration du midbody n'est donc pas dicté uniquement par la néoformation des jonctions septées en apical de sa position. D'autres facteurs entrent en jeu pour freiner la migration du midbody lorsqu'il est présent dans la strate des jonctions septées. Je propose donc le modèle suivant : dans un contexte sauvage, l'organisation des jonctions septées et les contacts maintenus avec les cellules voisines sont un frein à la migration du midbody vers le pôle basal. L'assemblage progressif *de novo* des jonctions septées en apical du midbody est donc le paramètre limitant à la migration du midbody et des protrusions de membrane des cellules voisines. Une fois sorti de la strate des jonctions septées, le midbody n'est plus soumis à la résistance médiée par leur organisation et sa migration vers le pôle basal se trouve accélérée. Ensemble, le maintien des contacts avec les cellules voisines

et le lent assemblage orienté des jonctions septées en apical du midbody favorisent le maintien de l'intégrité du tissu au cours de la division des cellules épithéliales.

8- Un processus conservé chez les vertébrés.

Chez les vertébrés, la barrière de perméabilité est assurée par les jonctions serrées, en apical des jonctions adhérentes. Ces jonctions sont moins étendues que les jonctions septées, ce qui est un obstacle à la dissection des mécanismes de formation des nouvelles jonctions au cours de la cytodierèse. Malgré cette différence majeure entre vertébrés et invertébrés, plusieurs points communs sont à noter quant au déroulement de la cytodierèse et la formation de la nouvelle interface entre les cellules sœurs. Chez les vertébrés, l'implication des cellules voisines pendant la cytodierèse des cellules épithéliales est démontrée (Higashi et al., 2016). Cette étude réalisée dans l'embryon de xénope met également en évidence le maintien de la barrière de perméabilité tout au long de la cytodierèse. De manière intéressante, la cytodierèse des cellules épithéliales de vertébrés est polarisée et aboutie à la formation du midbody en apical des jonctions adhérentes, au sein des jonctions serrées (Jinguji et Ishikawa, 1992 ; Higashi et al., 2016). Enfin, des jonctions tri-cellulaires se forment de part et d'autre du midbody et en basal de celui-ci (Figure 5D'' de Higashi et al., 2016). Si l'on compare les deux systèmes, vertébrés et invertébrés, la localisation de la barrière de perméabilité, du midbody et des nouvelles jonctions tri-cellulaires présente une parfaite symétrie relative aux jonctions adhérentes. Chez les vertébrés, comme chez les invertébrés, le midbody se forme au sein de la barrière de perméabilité, respectivement en apical et en basal des jonctions adhérentes. Les jonctions tri-cellulaires se forment quant à elles, respectivement en basal et en apical du midbody. Si l'organisation apico-basale des deux systèmes est opposée, dans les deux cas la maturation et la migration du midbody ont lieu au sein de la barrière de perméabilité. Sur la base de nos observations, la coordination entre la maturation du midbody au sein de la barrière de

perméabilité et la formation de cette dernière à l'interface entre les cellules sœurs est conservée chez les vertébrés pour permettre le maintien de l'intégrité du tissu au cours de la division des cellules épithéliales, divisions nécessaires à la croissance et à la régénération du tissu.

V- Matériels et méthodes

Stocks de drosophiles et génétique

Le maintien des stocks de drosophiles et les croisements sont effectués à 25°C. Les pupes sont disséquées à 16h APF (After Pupa Formation) excepté lorsque mentionné dans le texte (expérience de KAEDE avant division). Pour générer les tissus mosaïques, l'expression de la flippase est induite par deux chocs thermiques de 1h à 37°C, espacés de 24h, au stade larvaire L2 et L3.

Les génotypes utilisés sont les suivants :

- w118
- y,w ; FRT(G13-42B) *pnut^{XP}*, DE-Cad::GFP^{GE23}, sqh-sqh::RFP / Cyo
- w, y, *sqh^{AX3}* / (+); sqh-sqh::RFP/+ ; ATPα::YFP / +
- ApGAL4, sep2::GFP / + ; UAS-*pnut*::mCherry / +
- w, y, *sqh^{AX3}* ; sqh-sqh::RFP/ Gli::YFP
- ApGAL4, Sep2::GFP / UASp.lifeAct-RFP
- w, y, *sqh^{AX3}* ; sqh-sqh::RFP/ +; jupiter::GFP / +
- w, y, *sqh^{AX3}* ; ApGAL4, Sep2::GFP / sqh-sqh::mCherry
- w ; DE-Cad::GFP^{GE23} / tub-PH::mRFP; Sb (TM3 Ser) / +
- Hs-Flp / + ; UAS-*shrb*::GFP / Ay-GAL4 ; sqh-sqh::mCherry / +
- w, y, *sqh^{AX3}* ; sqh-sqh::RFP/ Sv::GFP; Sb(TM3 Ser) / +
- pnrGAL4 / UAS-AurB::GFP
- ScaGAL4 / + ; ATPα::YFP, sqh::mCherry / UAS-KAEDE
- Hs-Flp / (+) ; FRT42D, nlsRFP / FRT42D, *shrb^{O3}*;ATPα::YFP , sqh::mCherry / +
- Hs-Flp / + ; FRT42D , nlsGFP / FRT42D, *shrb^{O3}*
- ApGAL4, Sep2::GFP / UAS-*shrb^{RNAi}*
- y, w, Hs-Flp , UAS-nucGFP-myc; FRT42D, tubGAL80 / FRT 42D, *shrb^{O3}* ; tubGAL4 / UAS-KAEDE
- Hs-FLP; sqh::RFP / if ; FRT 82B , ATPα::YFP / FRT 82B, nls::GFP

- w, y, *sqh^{AX3}* ; sqh::RFP / Bark::GFP
- sqh::RFP^{CRISPR};; ATPα::YFP / +
- sqh::RFP^{CRISPR}; Bark::GFP / +
- Hs-Flp ; *bark^{L200}* , FRT40A, FRT G13 (w-) / FRT 40A , nls RFP
- Hs-Flp / (+) ; *gli^{dv3}* , FRT40A, FRT G13 (w-) / FRT 40A , nls RFP
- y, w, Hs-Flp / sqh::RFP^{CRISPR} ; *gli^{dv3}*, FRT40A, FRT G13 (w-) /Ubi-nls::RFP, FRT40A, DECad::GFP^{GE23}
- y, w, Hs-Flp / sqh::RFP^{CRISPR} ; *bark^{L200}*, FRT40A, FRT G13 (w-) /Ubi-nls::RFP, FRT40A, DECad::GFP^{GE23}

Si ce n'est pas précisé, les stocks initiaux sont obtenus *via* le Bloomington *Drosophila* Stock Center. Les autres stocks utilisés sont E-Cad::GFP (Huang et al., 2009) ; *bark^{L200}*, FRT40A (Byri et al., 2015) ; *sqh^{AX3}*;; sqh-sqh::mCherry (Martin et al., 2009) ; *sqh^{AX3}*; sqh-sqh::RFP (R. Karess), FRT(G13-42B) *pnut^{XP}* (Neufeld et Rubin, 1994) ; UAS-sv::GFP, UAS-aurB::GFP et FRT42, *shrb^{O3}* (Mathieu et al., 2013) ; ATPα::YFP et Gli::YFP (Lowe et al., 2014).

Préparation des échantillons.

Les pupes vivantes sont posées sur un scotch double face entre des espaceurs formés de 4 et 5 lamelles. La case pupale recouvrant la tête et le thorax dorsal est enlevée, une lamelle préalablement enduit de Voltalef 10S recouvre l'animal. Pour les expériences d'immunomarquage, les thorax dorsaux sont disséqués dans du PBS1X et immédiatement fixés par du paraformaldéhyde 4%.

Pour les observations de TEM, les thorax dorsaux (16h APF) et les disques imaginaux d'ailes (larves L3) sont disséqués dans du PBS 1X et immédiatement fixés pendant 2h à température ambiante, par du paraformaldéhyde 1%, 2,5% glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate 0,1M. Puis ils sont placés 1h dans un tampon cacodylate osmium tétroxyde 2%, K₄[Fe(CN)₆] 1,5% suivi de 1 h dans un tampon cacodylate 100mM acide tannique 1%, 30 minutes dans l'osmium

tétraoxyde 2% et 2h dans l'acétate d'uranyle 1%. Après des cycles de déshydratation, les échantillons sont intégrés dans une résine Epon-Araldite.

Immunofluorescence et anticorps

Les thorax dorsaux sont disséqués, fixés et montés entre lame et lamelles comme décrit dans Founounou et al., 2013. Les anticorps primaires sont des anticorps de souris anti-Dlg (1 :200), de rat anti-E-Cad (1 :200), de souris anti-Gli (1 :100) et de souris anti-Fas3 (1 :500). Les anticorps secondaires couplés à Cy2, Cy3 et Cy5 proviennent des laboratoires Jackson (1 :200).

Imagerie confocale et analyse d'images.

La microscopie confocale en temps réel est réalisée à une température comprise entre 20 et 25°C. Les tissus fixés et vivants sont imagés sur des microscopes Leica SP5 et SP8 équipés d'un objectif 63X NA 1.4 et contrôlés par le logiciel LAS AF. Les sections confocales sont acquises tous les 0,5 µm.

L'analyse des données est réalisée grâce au logiciel ImageJ. L'immobilisation artificielle du midbody est effectuée par un suivi manuel du midbody. Les coordonnées 3D extraites à chaque temps permettent de réaligner artificiellement les images pour générer les kymographes. De la même manière, la distance entre le midbody et les jonctions adhérentes est obtenue par extraction des coordonnées 3D de ces deux structures à chaque temps. Les coordonnées respectives permettent le calcul de la distance par l'application du théorème de Pythagore.

Photo-conversion de la KAEDE

Afin de déterminer le moment de l'abscission, la KAEDE est photo-convertie, par 4 impulsions ponctuelles (bleach point) successives de laser 405nm à une puissance de 0.1% pendant 400ms (4 x 100ms), dans une des cellules sœurs à un temps déterminé après la transition anaphase (Figure 2B) ou aléatoirement dans une cellule avant la division (Figure 2C).

Expériences de FRAP.

Pour évaluer la dynamique de MyoII::RFP et Pnut::mCherry au niveau du midbody, des expériences de FRAP (Recouvrement de fluorescence après photoblanchiment) sont réalisées sur le midbody de cellules exprimant MyoII::RFP ou Pnut::mCherry simultanément à Sep2::GFP, utilisé pour le suivi du midbody au cours du temps. La fluorescence rouge est éteinte par une impulsion ponctuelle (bleach point) de laser 561nm à une puissance de 30% (Pnut::mCherry) et 40% (MyoII::RFP) pendant 500ms. Les images confocales sont ensuite acquises toutes les 2 minutes.

Pour déterminer la dynamique des composants de jonctions septées, dans les cellules en division ou en interphase, les expériences de FRAP sont réalisées sur des tissus exprimant ATPα::YFP, Bark::GFP ou Gli::YFP simultanément à MyoII::RFP. Une région d'intérêt correspondant à la jonction entière (cellule en interphase) ou à la structure en forme de doigt à proximité du midbody (cellule en division) est photo-blanchie par une impulsion de laser 488nm à une puissance de 100% pendant 100ms. Les images confocales sont ensuite acquises toutes les 5 minutes.

Mesure du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment.

Sur des kymographes, focalisés sur la jonction d'intérêt, à -1µm, -2µm ou au niveau du midbody, l'intensité moyenne de fluorescence de 13 pixels est mesurée au cours du temps. Ceci est réalisé pour la jonction photo-blanchie (A), les jonctions contrôles (3 pour les cellules en interphase, 1 pour les cellules en mitose (doigt opposé)) (C) et 3 bruits de fond (B). La différence entre la moyenne des contrôles et la moyenne des bruits de fond est estimée par un modèle polynomial d'ordre 2 (T). Le ratio (R) de l'intensité de fluorescence est calculé par l'équation suivante : $R = A - \text{moyenne (B)} / T$. Enfin, pour comparer les différentes conditions, les 3 valeurs mesurées avant photoblanchiment sont normalisées à 1.

Observations et analyses des données de TEM.

Les blocs rigides dans lesquels sont inclus les échantillons sont découpés à l'aide d'un diamant de coupe à 90° (Diatome, Biel, Suisse) pour délimiter la zone d'intérêt, en se basant sur des marques précédemment effectuées au laser. Pour les observations classiques de TEM, les échantillons sont directement découpés en fines sections grâce à un diamant à 35°(Diatome, Biel, Suisse). Pour les analyses à haute résolution, les sections sont collectées sur une grille à fentes recouvertes de formvar (EMS) et analysées avec un microscope électronique JEOL JEM-1400, fonctionnant à 80kV et équipé d'une caméra Gatan Orius SC 1000 pilotée par le programme Digital Micrograph.

Pour les analyses en 3 dimensions, les blocs rigides sont fixés par de la super glue à une broche de cryo-fixation en aluminium (cyanoacrylate, Permabond). Pour la découpe, un grand soin est pris pour orienter l'échantillon de façon à ce que le plan d'imagerie soit perpendiculaire à l'axe de la broche afin de former une face trapézoïdale d'environ 500x500x150µm, finalement monté sur un Gatan-3view d'un microscope électronique à balayage FEI Quanta 250 FEG.

Les données brutes sont converties en une pile de fichiers MRC par le logiciel IMOD. Le bruit d'imagerie est lissé par un lissage gaussien standard afin de faciliter la segmentation manuelle des images.

L'analyse des données de TEM est réalisée sous le logiciel Fiji et le module IMOD 3Dmod pour les annotations de régions particulières et la modélisation. Illustrator est utilisé pour l'alignement des séries de sections et la coloration artificielle des différentes zones de l'image.

VI- Références

- Abadía-Molina, F., Morón-Calvente, V., Baird, S. D., Shamim, F., Martín, F., & MacKenzie, A. (2017). Neuronal apoptosis inhibitory protein (NAIP) localizes to the cytokinetic machinery during cell division. *Sci Rep*, 7, 39981. doi:10.1038/srep39981
- Agromayor, M., & Martin-Serrano, J. (2013). Knowing when to cut and run: mechanisms that control cytokinetic abscission. *Trends Cell Biol*, 23(9), 433-441. doi:10.1016/j.tcb.2013.04.006
- Auld, V. J., Fetter, R. D., Broadie, K., & Goodman, C. S. (1995). Gliotactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in *Drosophila*. *Cell*, 81(5), 757-767.
- Azmi, I. F., Davies, B. A., Xiao, J., Babst, M., Xu, Z., & Katzmann, D. J. (2008). ESCRT-III family members stimulate Vps4 ATPase activity directly or via Vta1. *Dev Cell*, 14(1), 50-61. doi:10.1016/j.devcel.2007.10.021
- 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. *EMBO J*, 17(11), 2982-2993. doi:10.1093/emboj/17.11.2982
- Bache, K. G., Brech, A., Mehlum, A., & Stenmark, H. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*, 162(3), 435-442. doi:10.1083/jcb.200302131
- Baker, J., & Garrod, D. (1993). Epithelial cells retain junctions during mitosis. *J Cell Sci*, 104 (Pt 2), 415-425.
- Balasubramanian, M. K., Srinivasan, R., Huang, Y., & Ng, K. H. (2012). Comparing contractile apparatus-driven cytokinesis mechanisms across kingdoms. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 69(11), 942-956. doi:10.1002/cm.21082
- Balda, M. S., González-Mariscal, L., Contreras, R. G., Macias-Silva, M., Torres-Marquez, M. E., García-Sáinz, J. A., & Cereijido, M. (1991). Assembly and sealing of tight junctions: possible participation of G-proteins, phospholipase C, protein kinase C and calmodulin. *J Membr Biol*, 122(3), 193-202.
- Balda, M. S., & Matter, K. (2016). Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Curr Opin Cell Biol*, 42, 94-101. doi:10.1016/j.ceb.2016.05.006
- Ban, R., Irino, Y., Fukami, K., & Tanaka, H. (2004). Human mitotic spindle-associated protein PRC1 inhibits MgcRacGAP activity toward Cdc42 during the metaphase. *J Biol Chem*, 279(16), 16394-16402. doi:10.1074/jbc.M313257200
- Banerjee, S., Pillai, A. M., Paik, R., Li, J., & Bhat, M. A. (2006). Axonal ensheathment and septate junction formation in the peripheral nervous

- system of *Drosophila*. *J Neurosci*, 26(12), 3319-3329. doi:10.1523/JNEUROSCI.5383-05.2006
- Banerjee, S., Sousa, A. D., & Bhat, M. A. (2006). Organization and function of septate junctions: an evolutionary perspective. *Cell Biochem Biophys*, 46(1), 65-77. doi:10.1385/CBB:46:1:65
- Bastos, R. N., & Barr, F. A. (2010). Plk1 negatively regulates Cep55 recruitment to the midbody to ensure orderly abscission. *J Cell Biol*, 191(4), 751-760. doi:10.1083/jcb.201008108
- Behr, M., Riedel, D., & Schuh, R. (2003). The claudin-like megatrachea is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in *Drosophila*. *Dev Cell*, 5(4), 611-620.
- Bement, W. M., Benink, H. A., & von Dassow, G. (2005). A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification. *J Cell Biol*, 170(1), 91-101. doi:10.1083/jcb.200501131
- Benton, R., & St Johnston, D. (2003). *Drosophila* PAR-1 and 14-3-3 inhibit Bazooka/PAR-3 to establish complementary cortical domains in polarized cells. *Cell*, 115(6), 691-704.
- Betschinger, J., Mechtler, K., & Knoblich, J. A. (2003). The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl. *Nature*, 422(6929), 326-330. doi:10.1038/nature01486
- Bi, G. Q., Alderton, J. M., & Steinhardt, R. A. (1995). Calcium-regulated exocytosis is required for cell membrane resealing. *J Cell Biol*, 131(6 Pt 2), 1747-1758.
- Bilder, D., Li, M., & Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science*, 289(5476), 113-116.
- Bilder, D., & Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature*, 403(6770), 676-680. doi:10.1038/35001108
- Bilder, D., Schober, M., & Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nat Cell Biol*, 5(1), 53-58. doi:10.1038/ncb897
- Blanco, G., & Mercer, R. W. (1998). Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol*, 275(5 Pt 2), F633-650.
- Bosveld, F., Markova, O., Guirao, B., Martin, C., Wang, Z., Pierre, A., . . . Bellaïche, Y. (2016). Epithelial tricellular junctions act as interphase cell shape sensors to orient mitosis. *Nature*, 530(7591), 495-498. doi:10.1038/nature16970
- Botti, S. A., Felder, C. E., Sussman, J. L., & Silman, I. (1998). Electrotactins: a class of adhesion proteins with conserved electrostatic and structural motifs. *Protein Eng*, 11(6), 415-420.
- Burns, A. R., Walker, D. C., Brown, E. S., Thurmon, L. T., Bowden, R. A., Keese, C. R., Smith, C. W. (1997). Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular

- corners. *J Immunol*, 159(6), 2893-2903.
- Byri, S., Misra, T., Syed, Z. A., Bätz, T., Shah, J., Boril, L., Luschnig, S. (2015). The Triple-Repeat Protein Anakonda Controls Epithelial Tricellular Junction Formation in *Drosophila*. *Dev Cell*, 33(5), 535-548. doi:10.1016/j.devcel.2015.03.023
- Capalbo, L., Montembault, E., Takeda, T., Bassi, Z. I., Glover, D. M., & D'Avino, P. P. (2012). The chromosomal passenger complex controls the function of endosomal sorting complex required for transport-III Snf7 proteins during cytokinesis. *Open Biol*, 2(5), 120070. doi:10.1098/rsob.120070
- 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*, 336(6078), 220-225. doi:10.1126/science.1217180
- Carlton, J. G., & Martin-Serrano, J. (2007). Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science*, 316(5833), 1908-1912. doi:10.1126/science.1143422
- Carvalho, A., Desai, A., & Oegema, K. (2009). Structural memory in the contractile ring makes the duration of cytokinesis independent of cell size. *Cell*, 137(5), 926-937. doi:10.1016/j.cell.2009.03.021
- Cavey, M., & Lecuit, T. (2009). Molecular bases of cell-cell junctions stability and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(5), a002998. doi:10.1101/cshperspect.a002998
- Cereijido, M., Robbins, E. S., Dolan, W. J., Rotunno, C. A., & Sabatini, D. D. (1978). Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol*, 77(3), 853-880.
- Chai, Y., Tian, D., Yang, Y., Feng, G., Cheng, Z., Li, W., & Ou, G. (2012). Apoptotic regulators promote cytokinetic midbody degradation in *C. elegans*. *J Cell Biol*, 199(7), 1047-1055. doi:10.1083/jcb.201209050
- Chambers R. & Chambers E. (1961). Explorations into the Nature of the Living Cell. *Harvard University Press*.
- Chartier, F. J., Hardy, É., & Laprise, P. (2011). Crumbs controls epithelial integrity by inhibiting Rac1 and PI3K. *J Cell Sci*, 124(Pt 20), 3393-3398. doi:10.1242/jcs.092601
- Cheffings, T. H., Burroughs, N. J., & Balasubramanian, M. K. (2016). Actomyosin Ring Formation and Tension Generation in Eukaryotic Cytokinesis. *Curr Biol*, 26(15), R719-R737. doi:10.1016/j.cub.2016.06.071
- Chishti, A. H., Kim, A. C., Marfatia, S. M., Lutchnan, M., Hanspal, M., Jindal, H., Hoover, K. B. (1998). The FERM domain: a unique module involved in the linkage of cytoplasmic proteins to the membrane. *Trends Biochem Sci*, 23(8), 281-282.
- D'Avino, P. P. (2009). How to scaffold the contractile ring for a safe cytokinesis - lessons from Anillin-related proteins. *J Cell Sci*, 122(Pt 8), 1071-1079. doi:10.1242/jcs.034785
- D'Avino, P. P., & Capalbo, L. (2016). Regulation of midbody formation and function by mitotic kinases. *Semin Cell Dev Biol*, 53, 57-63.

- doi:10.1016/j.semcdb.2016.01.018
- Dambournet, D., Machicoane, M., Chesneau, L., Sachse, M., Rocancourt, M., El Marjou, A., Echard, A. (2011). Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol*, 13(8), 981-988. doi:10.1038/ncb2279
- Dechant, R., & 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(3), 333-344.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., & Weis, W. I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, 123(5), 903-915. doi:10.1016/j.cell.2005.09.021
- Eggert, U. S., Mitchison, T. J., & Field, C. M. (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annu Rev Biochem*, 75, 543-566. doi:10.1146/annurev.biochem.74.082803.133425
- Eikenes, Å., Malerød, L., Christensen, A. L., Steen, C. B., Mathieu, J., Nezis, I. P., Haglund, K. (2015). ALIX and ESCRT-III coordinately control cytokinetic abscission during germline stem cell division in vivo. *PLoS Genet*, 11(1), e1004904. doi:10.1371/journal.pgen.1004904
- El Amine, N., Kechad, A., Jananji, S., & Hickson, G. R. (2013). Opposing actions of septins and Sticky on Anillin promote the transition from contractile to midbody ring. *J Cell Biol*, 203(3), 487-504. doi:10.1083/jcb.201305053
- Elad, N., Abramovitch, S., Sabanay, H., & Medalia, O. (2011). Microtubule organization in the final stages of cytokinesis as revealed by cryo-electron tomography. *J Cell Sci*, 124(Pt 2), 207-215. doi:10.1242/jcs.073486
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(12), 4846-4851. doi:10.1073/pnas.1102714108
- Elsum, I., Yates, L., Humbert, P. O., & Richardson, H. E. (2012). The Scribble-Dlg-Lgl polarity module in development and cancer: from flies to man. *Essays Biochem*, 53, 141-168. doi:10.1042/bse0530141
- Faivre-Sarrailh, C., Banerjee, S., Li, J., Hortsch, M., Laval, M., & Bhat, M. A. (2004). Drosophila contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. *Development*, 131(20), 4931-4942. doi:10.1242/dev.01372
- FARQUHAR, M. G., & PALADE, G. E. (1963). Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 17, 375-412.
- Fehon, R. G., Dawson, I. A., & Artavanis-Tsakonas, S. (1994). A Drosophila homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the coracle gene. *Development*, 120(3), 545-557.
- Flores-Benitez, D., & Knust, E. (2016). Dynamics of epithelial cell polarity in Drosophila: how to regulate the regulators? *Curr Opin Cell Biol*, 42, 13-21.

- doi:10.1016/j.ceb.2016.03.018
- Founounou, N., Loyer, N., & Le Borgne, R. (2013). Septins regulate the contractility of the actomyosin ring to enable adherens junction remodeling during cytokinesis of epithelial cells. *Dev Cell*, *24*(3), 242-255. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.008
- Fristrom, D. K. (1982). Septate junctions in imaginal disks of *Drosophila*: a model for the redistribution of septa during cell rearrangement. *J Cell Biol*, *94*(1), 77-87.
- Fukumatsu, M., Ogawa, M., Arakawa, S., Suzuki, M., Nakayama, K., Shimizu, S., Sasakawa, C. (2012). Shigella targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells. *Cell Host Microbe*, *11*(4), 325-336. doi:10.1016/j.chom.2012.03.001
- Furuse, M., Izumi, Y., Oda, Y., Higashi, T., & Iwamoto, N. (2014). Molecular organization of tricellular tight junctions. *Tissue Barriers*, *2*, e28960. doi:10.4161/tisb.28960
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*, *143*(2), 391-401.
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J., & Hopkins, C. R. (1996). Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J Cell Biol*, *132*(6), 1011-1023.
- Gangar, A., Rossi, G., Andreeva, A., Hales, R., & Brennwald, P. (2005). Structurally conserved interaction of Lgl family with SNAREs is critical to their cellular function. *Curr Biol*, *15*(12), 1136-1142. doi:10.1016/j.cub.2005.05.046
- Genova, J. L., & Fehon, R. G. (2003). Neuroglian, Gliotactin, and the Na⁺/K⁺ ATPase are essential for septate junction function in *Drosophila*. *J Cell Biol*, *161*(5), 979-989. doi:10.1083/jcb.200212054
- Gershony, O., Pe'er, T., Noach-Hirsh, M., Elia, N., & Tzur, A. (2014). Cytokinetic abscission is an acute G1 event. *Cell Cycle*, *13*(21), 3436-3441. doi:10.4161/15384101.2014.956486
- Gill, D. J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Emr, S. D., & Williams, R. L. (2007). Structural insight into the ESCRT-I/II link and its role in MVB trafficking. *EMBO J*, *26*(2), 600-612. doi:10.1038/sj.emboj.7601501
- Gloerich, M., Bianchini, J. M., Siemers, K. A., Cohen, D. J., & Nelson, W. J. (2017). Cell division orientation is coupled to cell-cell adhesion by the E-cadherin/LGN complex. *Nat Commun*, *8*, 13996. doi:10.1038/ncomms13996
- Glotzer, M. (2009). The 3Ms of central spindle assembly: microtubules, motors and MAPs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *10*(1), 9-20. doi:10.1038/nrm2609
- González-Mariscal, L., Domínguez-Calderón, A., Raya-Sandino, A., Ortega-Olvera, J. M., Vargas-Sierra, O., & Martínez-Revollar, G. (2014). Tight junctions and the regulation of gene expression. *Semin Cell Dev Biol*, *36*,

- 213-223. doi:10.1016/j.semcdb.2014.08.009
- Goodman, K. M., Yamagata, M., Jin, X., Mannepalli, S., Katsamba, P. S., Ahlsén, G., Shapiro, L. (2016). Molecular basis of sidekick-mediated cell-cell adhesion and specificity. *Elife*, 5. doi:10.7554/eLife.19058
- Graf, F., Noirot-Timothee, C., & Noirot, C. (1982). The specialization of septate junctions in regions of tricellular junctions. I. Smooth septate junctions (=continuous junctions). *J Ultrastruct Res*, 78(2), 136-151.
- Green, R. A., Paluch, E., & Oegema, K. (2012). Cytokinesis in animal cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28, 29-58. doi:10.1146/annurev-cellbio-101011-155718
- Grenningloh, G., Rehm, E. J., & Goodman, C. S. (1991). Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*: fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule. *Cell*, 67(1), 45-57.
- Guillot, C., & Lecuit, T. (2013). Adhesion disengagement uncouples intrinsic and extrinsic forces to drive cytokinesis in epithelial tissues. *Dev Cell*, 24(3), 227-241. doi:10.1016/j.devcel.2013.01.010
- Guizetti, J., & Gerlich, D. W. (2012). ESCRT-III polymers in membrane neck constriction. *Trends Cell Biol*, 22(3), 133-140. doi:10.1016/j.tcb.2011.11.007
- Guizetti, J., Schermelleh, L., Mäntler, J., Maar, S., Poser, I., Leonhardt, H., Gerlich, D. W. (2011). Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science*, 331(6024), 1616-1620. doi:10.1126/science.1201847
- Guse, A., Mishima, M., & Glotzer, M. (2005). Phosphorylation of ZEN-4/MKLP1 by aurora B regulates completion of cytokinesis. *Curr Biol*, 15(8), 778-786. doi:10.1016/j.cub.2005.03.041
- Göttlinger, H. G., Dorfman, T., Sodroski, J. G., & Haseltine, W. A. (1991). Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(8), 3195-3199.
- Hall, S., Bone, C., Oshima, K., Zhang, L., McGraw, M., Lucas, B., Ward, R. E. (2014). Macroglobulin complement-related encodes a protein required for septate junction organization and paracellular barrier function in *Drosophila*. *Development*, 141(4), 889-898. doi:10.1242/dev.102152
- Harris, T. J., & Tepass, U. (2010). Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(7), 502-514. doi:10.1038/nrm2927
- HEILBRUNN, L. V. (1956). Cellular physiology and aging. *Fed Proc*, 15(3), 948-953.
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT pathway. *Dev Cell*, 21(1), 77-91. doi:10.1016/j.devcel.2011.05.015
- Herszterg, S., Leibfried, A., Bosveld, F., Martin, C., & Bellaiche, Y. (2013). Interplay between the dividing cell and its neighbors regulates adherens junction formation during cytokinesis in epithelial tissue. *Dev Cell*, 24(3), 256-270. doi:10.1016/j.devcel.2012.11.019
- Herszterg, S., Pinheiro, D., & Bellaïche, Y. (2014). A multicellular view of

- cytokinesis in epithelial tissue. *Trends Cell Biol*, 24(5), 285-293. doi:10.1016/j.tcb.2013.11.009
- Hierro, A., Sun, J., Rusnak, A. S., Kim, J., Prag, G., Emr, S. D., & Hurley, J. H. (2004). Structure of the ESCRT-II endosomal trafficking complex. *Nature*, 431(7005), 221-225. doi:10.1038/nature02914
- Higashi, T., & Miller, A. L. (2017). Tricellular junctions: how to build junctions at the TRICKiest points of epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 28(15), 2023-2034. doi:10.1091/mbc.E16-10-0697
- Higashi, T., Tokuda, S., Kitajiri, S., Masuda, S., Nakamura, H., Oda, Y., & Furuse, M. (2013). Analysis of the 'angulin' proteins LSR, ILDR1 and ILDR2--tricellulin recruitment, epithelial barrier function and implication in deafness pathogenesis. *J Cell Sci*, 126(Pt 4), 966-977. doi:10.1242/jcs.116442
- Hijazi, A., Masson, W., Augé, B., Waltzer, L., Haenlin, M., & Roch, F. (2009). boudin is required for septate junction organisation in *Drosophila* and codes for a diffusible protein of the Ly6 superfamily. *Development*, 136(13), 2199-2209. doi:10.1242/dev.033845
- Hu, C. K., Coughlin, M., & Mitchison, T. J. (2012). Midbody assembly and its regulation during cytokinesis. *Mol Biol Cell*, 23(6), 1024-1034. doi:10.1091/mbc.E11-08-0721
- Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A. M., & Hong, Y. (2009). From the Cover: Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(20), 8284-8289. doi:10.1073/pnas.0900641106
- Huber, D., Balda, M. S., & Matter, K. (2000). Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils. *J Biol Chem*, 275(8), 5773-5778.
- Hurov, J. B., Watkins, J. L., & Piwnicka-Worms, H. (2004). Atypical PKC phosphorylates PAR-1 kinases to regulate localization and activity. *Curr Biol*, 14(8), 736-741. doi:10.1016/j.cub.2004.04.007
- Hutterer, A., Glotzer, M., & Mishima, M. (2009). Clustering of centralspindlin is essential for its accumulation to the central spindle and the midbody. *Curr Biol*, 19(23), 2043-2049. doi:10.1016/j.cub.2009.10.050
- Hümmer, S., & Mayer, T. U. (2009). Cdk1 negatively regulates midzone localization of the mitotic kinesin Mklp2 and the chromosomal passenger complex. *Curr Biol*, 19(7), 607-612. doi:10.1016/j.cub.2009.02.046
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., & Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, 171(6), 939-945. doi:10.1083/jcb.200510043
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., & Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*, 147(6), 1351-1363.
- Itoh, M., Tsukita, S., Yamazaki, Y., & Sugimoto, H. (2012). Rho GTP exchange factor ARHGEF11 regulates the integrity of epithelial junctions by connecting ZO-1 and RhoA-myosin II signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(25), 9905-9910. doi:10.1073/pnas.1115063109

- Izumi, Y., & Furuse, M. (2014). Molecular organization and function of invertebrate occluding junctions. *Semin Cell Dev Biol*, *36*, 186-193. doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.009
- Jimenez, A. J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., & Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*, *343*(6174), 1247136. doi:10.1126/science.1247136
- Jinguji, Y., & Ishikawa, H. (1992). Electron microscopic observations on the maintenance of the tight junction during cell division in the epithelium of the mouse small intestine. *Cell Struct Funct*, *17*(1), 27-37.
- Kachar, B., & Reese, T. S. (1982). Evidence for the lipidic nature of tight junction strands. *Nature*, *296*(5856), 464-466.
- Kamasaki, T., Osumi, M., & Mabuchi, I. (2007). Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J Cell Biol*, *178*(5), 765-771. doi:10.1083/jcb.200612018
- Kaplan, J. H. (2002). Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem*, *71*, 511-535. doi:10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218
- Katzmann, D. J., Stefan, C. J., Babst, M., & Emr, S. D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J Cell Biol*, *162*(3), 413-423. doi:10.1083/jcb.200302136
- Kechad, A., Jananji, S., Ruella, Y., & Hickson, G. R. (2012). Anillin acts as a bifunctional linker coordinating midbody ring biogenesis during cytokinesis. *Curr Biol*, *22*(3), 197-203. doi:10.1016/j.cub.2011.11.062
- Kikonyogo, A., Bouamr, F., Vana, M. L., Xiang, Y., Aiyar, A., Carter, C., & Leis, J. (2001). Proteins related to the Nedd4 family of ubiquitin protein ligases interact with the L domain of Rous sarcoma virus and are required for gag budding from cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(20), 11199-11204. doi:10.1073/pnas.201268998
- Knust, E., & Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science*, *298*(5600), 1955-1959. doi:10.1126/science.1072161
- Konstantinidis, D. G., Giger, K. M., Risinger, M., Pushkaran, S., Zhou, P., Dexheimer, P., Kalfa, T. A. (2015). Cytokinesis failure in RhoA-deficient mouse erythroblasts involves actomyosin and midbody dysregulation and triggers p53 activation. *Blood*, *126*(12), 1473-1482. doi:10.1182/blood-2014-12-616169
- Kostelansky, M. S., Sun, J., Lee, S., Kim, J., Ghirlando, R., Hierro, A., Hurley, J. H. (2006). Structural and functional organization of the ESCRT-I trafficking complex. *Cell*, *125*(1), 113-126. doi:10.1016/j.cell.2006.01.049
- Kotak, S., Busso, C., & Gönczy, P. (2012). Cortical dynein is critical for proper spindle positioning in human cells. *J Cell Biol*, *199*(1), 97-110. doi:10.1083/jcb.201203166
- Krug, S. M., Amasheh, S., Richter, J. F., Milatz, S., Günzel, D., Westphal, J. K., Fromm, M. (2009). Tricellulin forms a barrier to macromolecules in tricellular tight junctions without affecting ion permeability. *Mol Biol Cell*,

- 20(16), 3713-3724. doi:10.1091/mbc.E09-01-0080
- Kusakabe, M., & Nishida, E. (2004). The polarity-inducing kinase Par-1 controls *Xenopus* gastrulation in cooperation with 14-3-3 and aPKC. *EMBO J*, 23(21), 4190-4201. doi:10.1038/sj.emboj.7600381
- König, J., Frankel, E. B., Audhya, A., & Müller-Reichert, T. (2017). Membrane remodeling during embryonic abscission in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol*, 216(5), 1277-1286. doi:10.1083/jcb.201607030
- Lafaurie-Janvore, J., Maiuri, P., Wang, I., Pinot, M., Manneville, J. B., Betz, T., Piel, M. (2013). ESCRT-III assembly and cytokinetic abscission are induced by tension release in the intercellular bridge. *Science*, 339(6127), 1625-1629. doi:10.1126/science.1233866
- Lamb, R. S., Ward, R. E., Schweizer, L., & Fehon, R. G. (1998). *Drosophila* coracle, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate junctions and developmental functions in embryonic and adult epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 9(12), 3505-3519.
- Lane, N. J., Campiglia, S. S., & Lee, W. M. (1994). Junctional types in the tissues of an onychophoran: the apparent lack of gap and tight junctions in *Peripatus*. *Tissue Cell*, 26(1), 143-154.
- Lane, N. J., & Swales, L. S. (1982). Stages in the assembly of pleated and smooth septate junctions in developing insect embryos. *J Cell Sci*, 56, 245-262.
- Laprise, P., Beronja, S., Silva-Gagliardi, N. F., Pellikka, M., Jensen, A. M., McGlade, C. J., & Tepass, U. (2006). The FERM protein Yurt is a negative regulatory component of the Crumbs complex that controls epithelial polarity and apical membrane size. *Dev Cell*, 11(3), 363-374. doi:10.1016/j.devcel.2006.06.001
- Laprise, P., Lau, K. M., Harris, K. P., Silva-Gagliardi, N. F., Paul, S. M., Beronja, S., Tepass, U. (2009). Yurt, Coracle, Neurexin IV and the Na(+),K(+)-ATPase form a novel group of epithelial polarity proteins. *Nature*, 459(7250), 1141-1145. doi:10.1038/nature08067
- Le Bras, S., & Le Borgne, R. (2014). Epithelial cell division - multiplying without losing touch. *J Cell Sci*, 127(Pt 24), 5127-5137. doi:10.1242/jcs.151472
- 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(5901), 576-580. doi:10.1126/science.1162042
- Leung, L., Kloppper, A. V., Grill, S. W., Harris, W. A., & Norden, C. (2011). Apical migration of nuclei during G2 is a prerequisite for all nuclear motion in zebrafish neuroepithelia. *Development*, 138(22), 5003-5013. doi:10.1242/dev.071522
- Lewellyn, L., Carvalho, A., Desai, A., Maddox, A. S., & Oegema, K. (2011). The chromosomal passenger complex and centralspindlin independently contribute to contractile ring assembly. *J Cell Biol*, 193(1), 155-169. doi:10.1083/jcb.201008138
- Lindås, A. C., Karlsson, E. A., Lindgren, M. T., Ettema, T. J., & Bernander, R. (2008). A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A*, 105(48), 18942-18946. doi:10.1073/pnas.0809467105
- Llimargas, M., Strigini, M., Katidou, M., Karagozeos, D., & Casanova, J. (2004). Lachesin is a component of a septate junction-based mechanism that controls tube size and epithelial integrity in the *Drosophila* tracheal system. *Development*, 131(1), 181-190. doi:10.1242/dev.00917
- Lowe, N., Rees, J. S., Roote, J., Ryder, E., Armean, I. M., Johnson, G., Consortium, U. D. P. T. S. (2014). Analysis of the expression patterns, subcellular localisations and interaction partners of *Drosophila* proteins using a pigP protein trap library. *Development*, 141(20), 3994-4005. doi:10.1242/dev.111054
- Lu, Q., Hope, L. W., Brasch, M., Reinhard, C., & Cohen, S. N. (2003). TSG101 interaction with HRS mediates endosomal trafficking and receptor down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 7626-7631. doi:10.1073/pnas.0932599100
- Luhtala, N., & Odorizzi, G. (2004). Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol*, 166(5), 717-729. doi:10.1083/jcb.200403139
- Lye, C. M., Naylor, H. W., & Sanson, B. (2014). Subcellular localisations of the CPTI collection of YFP-tagged proteins in *Drosophila* embryos. *Development*, 141(20), 4006-4017. doi:10.1242/dev.111310
- Martin, A. C., Kaschube, M., & Wieschaus, E. F. (2009). Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature*, 457(7228), 495-499. doi:10.1038/nature07522
- Martin-Serrano, J., Eastman, S. W., Chung, W., & Bieniasz, P. D. (2005). HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol*, 168(1), 89-101. doi:10.1083/jcb.200408155
- Martin-Serrano, J., Yarovoy, A., Perez-Caballero, D., Bieniasz, P. D., & Yarovoy, A. (2003). Divergent retroviral late-budding domains recruit vacuolar protein sorting factors by using alternative adaptor proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(21), 12414-12419. doi:10.1073/pnas.2133846100
- Martin-Serrano, J., Zang, T., & Bieniasz, P. D. (2003). Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol*, 77(8), 4794-4804.
- Martz, M. K., Grabocka, E., Beeharry, N., Yen, T. J., & Wedegaertner, P. B. (2013). Leukemia-associated RhoGEF (LARG) is a novel RhoGEF in cytokinesis and required for the proper completion of abscission. *Mol Biol Cell*, 24(18), 2785-2794. doi:10.1091/mbc.E12-07-0533
- Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., . . . Furuse, M. (2011). LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J Cell Sci*, 124(Pt 4), 548-555. doi:10.1242/jcs.072058
- Mathieu, J., Cauvin, C., Moch, C., Radford, S. J., Sampaio, P., Perdigoto, C. N., Huynh, J. R. (2013). Aurora B and cyclin B have opposite effects on the timing of cytokinesis abscission in *Drosophila* germ cells and in vertebrate somatic cells. *Dev Cell*, 26(3), 250-265. doi:10.1016/j.devcel.2013.07.005
- Matsumura, F. (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher

- eukaryotes. *Trends Cell Biol*, 15(7), 371-377. doi:10.1016/j.tcb.2005.05.004
- McCarthy, K. M., Francis, S. A., McCormack, J. M., Lai, J., Rogers, R. A., Skare, I. B., . . . Schneeberger, E. E. (2000). Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells. *J Cell Sci*, 113 Pt 19, 3387-3398.
- McCullough, J., Colf, L. A., & Sundquist, W. I. (2013). Membrane fission reactions of the mammalian ESCRT pathway. *Annu Rev Biochem*, 82, 663-692. doi:10.1146/annurev-biochem-072909-101058
- McCullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I., & Hill, C. P. (2008). ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(22), 7687-7691. doi:10.1073/pnas.0801567105
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, 296(5566), 298-300. doi:10.1126/science.1068883
- Mendes Pinto, I., Rubinstein, B., Kucharavy, A., Unruh, J. R., & Li, R. (2012). Actin depolymerization drives actomyosin ring contraction during budding yeast cytokinesis. *Dev Cell*, 22(6), 1247-1260. doi:10.1016/j.devcel.2012.04.015
- Mendes Pinto, I., Rubinstein, B., & Li, R. (2013). Force to divide: structural and mechanical requirements for actomyosin ring contraction. *Biophys J*, 105(3), 547-554. doi:10.1016/j.bpj.2013.06.033
- Meng, W., & Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), a002899. doi:10.1101/cshperspect.a002899
- Meyer, E. J., Ikmi, A., & Gibson, M. C. (2011). Interkinetic nuclear migration is a broadly conserved feature of cell division in pseudostratified epithelia. *Curr Biol*, 21(6), 485-491. doi:10.1016/j.cub.2011.02.002
- Mierzwa, B., & Gerlich, D. W. (2014). Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Dev Cell*, 31(5), 525-538. doi:10.1016/j.devcel.2014.11.006
- Mierzwa, B. E., Chiaruttini, N., Redondo-Morata, L., von Filseck, J. M., König, J., Larios, J., Gerlich, D. W. (2017). Dynamic subunit turnover in ESCRT-III assemblies is regulated by Vps4 to mediate membrane remodelling during cytokinesis. *Nat Cell Biol*, 19(7), 787-798. doi:10.1038/ncb3559
- Mishima, M., Pavicic, V., Grüneberg, U., Nigg, E. A., & Glotzer, M. (2004). Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature*, 430(7002), 908-913. doi:10.1038/nature02767
- Miyake, K., & McNeil, P. L. (1995). Vesicle accumulation and exocytosis at sites of plasma membrane disruption. *J Cell Biol*, 131(6 Pt 2), 1737-1745.
- Mobasher, A., Avila, J., Cózar-Castellano, I., Brownleader, M. D., Trevan, M., Francis, M. J., Martín-Vasallo, P. (2000). Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci Rep*, 20(2), 51-91.

- Morais-de-Sá, E., Mirouse, V., & St Johnston, D. (2010). aPKC phosphorylation of Bazooka defines the apical/lateral border in *Drosophila* epithelial cells. *Cell*, *141*(3), 509-523. doi:10.1016/j.cell.2010.02.040
- Morais-de-Sá, E., & Sunkel, C. (2013). Adherens junctions determine the apical position of the midbody during follicular epithelial cell division. *EMBO Rep*, *14*(8), 696-703. doi:10.1038/embor.2013.85
- 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. *EMBO J*, *26*(19), 4215-4227. doi:10.1038/sj.emboj.7601850
- Moyer, K. E., & Jacobs, J. R. (2008). Varicose: a MAGUK required for the maturation and function of *Drosophila* septate junctions. *BMC Dev Biol*, *8*, 99. doi:10.1186/1471-213X-8-99
- Mullins, J. M., & Biesele, J. J. (1977). Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *J Cell Biol*, *73*(3), 672-684.
- Murthy, K., & Wadsworth, P. (2005). Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis. *Curr Biol*, *15*(8), 724-731. doi:10.1016/j.cub.2005.02.055
- Nakai, K., Tanaka, T., Murai, T., Ohguro, N., Tano, Y., & Miyasaka, M. (2005). Invasive human pancreatic carcinoma cells adhere to endothelial tri-cellular corners and increase endothelial permeability. *Cancer Sci*, *96*(11), 766-773. doi:10.1111/j.1349-7006.2005.00102.x
- Nakajima, Y., Meyer, E. J., Kroesen, A., McKinney, S. A., & Gibson, M. C. (2013). Epithelial junctions maintain tissue architecture by directing planar spindle orientation. *Nature*, *500*(7462), 359-362. doi:10.1038/nature12335
- Nelson, K. S., Furuse, M., & Beitel, G. J. (2010). The *Drosophila* Claudin Kune-kune is required for septate junction organization and tracheal tube size control. *Genetics*, *185*(3), 831-839. doi:10.1534/genetics.110.114959
- Neufeld, T. P., & Rubin, G. M. (1994). The *Drosophila* peanut gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell*, *77*(3), 371-379.
- Nguyen, D. N., Liu, Y., Litsky, M. L., & Reinke, R. (1997). The sidekick gene, a member of the immunoglobulin superfamily, is required for pattern formation in the *Drosophila* eye. *Development*, *124*(17), 3303-3312.
- Nilton, A., Oshima, K., Zare, F., Byri, S., Nannmark, U., Nyberg, K. G., Uv, A. E. (2010). Crooked, coiled and crimped are three Ly6-like proteins required for proper localization of septate junction components. *Development*, *137*(14), 2427-2437. doi:10.1242/dev.052605
- Nishimura, T., & Takeichi, M. (2009). Remodeling of the adherens junctions during morphogenesis. *Curr Top Dev Biol*, *89*, 33-54. doi:10.1016/S0070-2153(09)89002-9
- Nishimura, Y., & Yonemura, S. (2006). Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci*, *119*(Pt 1), 104-114. doi:10.1242/jcs.02737

- Noirot-Timothee, C., Graf, F., & Noirot, C. (1982). The specialization of septate junctions in regions of tricellular junctions. II. Pleated septate junctions. *J Ultrastruct Res*, *78*(2), 152-165.
- Norden, C., Young, S., Link, B. A., & Harris, W. A. (2009). Actomyosin is the main driver of interkinetic nuclear migration in the retina. *Cell*, *138*(6), 1195-1208. doi:10.1016/j.cell.2009.06.032
- Oda, Y., Otani, T., Ikenouchi, J., & Furuse, M. (2014). Tricellulin regulates junctional tension of epithelial cells at tricellular contacts through Cdc42. *J Cell Sci*, *127*(Pt 19), 4201-4212. doi:10.1242/jcs.150607
- Odell, G. M., & Foe, V. E. (2008). An agent-based model contrasts opposite effects of dynamic and stable microtubules on cleavage furrow positioning. *J Cell Biol*, *183*(3), 471-483. doi:10.1083/jcb.200807129
- Odorizzi, G., Katzmann, D. J., Babst, M., Audhya, A., & Emr, S. D. (2003). Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, *116*(Pt 10), 1893-1903. doi:10.1242/jcs.00395
- Oshima, K., & Fehon, R. G. (2011). Analysis of protein dynamics within the septate junction reveals a highly stable core protein complex that does not include the basolateral polarity protein Discs large. *J Cell Sci*, *124*(Pt 16), 2861-2871. doi:10.1242/jcs.087700
- Paul, S. M., Palladino, M. J., & Beitel, G. J. (2007). A pump-independent function of the Na,K-ATPase is required for epithelial junction function and tracheal tube-size control. *Development*, *134*(1), 147-155. doi:10.1242/dev.02710
- Paul, S. M., Ternet, M., Salvaterra, P. M., & Beitel, G. J. (2003). The Na⁺/K⁺ ATPase is required for septate junction function and epithelial tube-size control in the *Drosophila* tracheal system. *Development*, *130*(20), 4963-4974. doi:10.1242/dev.00691
- Peyre, E., Jaouen, F., Saadaoui, M., Haren, L., Merdes, A., Durbec, P., & Morin, X. (2011). A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells. *J Cell Biol*, *193*(1), 141-154. doi:10.1083/jcb.201101039
- Piekny, A. J., & Maddox, A. S. (2010). The myriad roles of Anillin during cytokinesis. *Semin Cell Dev Biol*, *21*(9), 881-891. doi:10.1016/j.semcdb.2010.08.002
- Pinheiro, D., Hannezo, E., Herszterg, S., Bosveld, F., Gaugue, I., Balakireva, M., Bellaïche, Y. (2017). Transmission of cytokinesis forces via E-cadherin dilution and actomyosin flows. *Nature*, *545*(7652), 103-107. doi:10.1038/nature22041
- Piper, R. C., & Katzmann, D. J. (2007). Biogenesis and function of multivesicular bodies. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *23*, 519-547. doi:10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123319
- Pollard, T. D. (2010). Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol*, *22*(1), 50-56. doi:10.1016/j.ceb.2009.11.010
- Prag, G., Watson, H., Kim, Y. C., Beach, B. M., Ghirlando, R., Hummer, G.,

- Hurley, J. H. (2007). The Vps27/Hse1 complex is a GAT domain-based scaffold for ubiquitin-dependent sorting. *Dev Cell*, *12*(6), 973-986. doi:10.1016/j.devcel.2007.04.013
- Quiros, M., Alarcón, L., Ponce, A., Giannakouros, T., & González-Mariscal, L. (2013). The intracellular fate of zonula occludens 2 is regulated by the phosphorylation of SR repeats and the phosphorylation/O-GlcNAcylation of S257. *Mol Biol Cell*, *24*(16), 2528-2543. doi:10.1091/mbc.E13-04-0224
- Quiros, M., & Nusrat, A. (2014). RhoGTPases, actomyosin signaling and regulation of the epithelial Apical Junctional Complex. *Semin Cell Dev Biol*, *36*, 194-203. doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.003
- Raiborg, C., Bremnes, B., Mehlum, A., Gillooly, D. J., D'Arrigo, A., Stang, E., & Stenmark, H. (2001). FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci*, *114*(Pt 12), 2255-2263.
- Raymond, C. K., Howald-Stevenson, I., Vater, C. A., & Stevens, T. H. (1992). Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell*, *3*(12), 1389-1402.
- Reid, E., Connell, J., Edwards, T. L., Duley, S., Brown, S. E., & Sanderson, C. M. (2005). The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum Mol Genet*, *14*(1), 19-38. doi:10.1093/hmg/ddi003
- Reinsch, S., & Karsenti, E. (1994). Orientation of spindle axis and distribution of plasma membrane proteins during cell division in polarized MDCKII cells. *J Cell Biol*, *126*(6), 1509-1526.
- Riazuddin, S., Ahmed, Z. M., Fanning, A. S., Lagziel, A., Kitajiri, S., Ramzan, K., Friedman, T. B. (2006). Tricellulin is a tight-junction protein necessary for hearing. *Am J Hum Genet*, *79*(6), 1040-1051. doi:10.1086/510022
- Rodriguez-Boulán, E., Kreitzer, G., & Müsch, A. (2005). Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *6*(3), 233-247. doi:10.1038/nrm1593
- Rujano, M. A., Sanchez-Pulido, L., Pannetier, C., le Dez, G., & Basto, R. (2013). The microcephaly protein Asp regulates neuroepithelium morphogenesis by controlling the spatial distribution of myosin II. *Nat Cell Biol*, *15*(11), 1294-1306. doi:10.1038/ncb2858
- Rüffer, C., & Gerke, V. (2004). The C-terminal cytoplasmic tail of claudins 1 and 5 but not its PDZ-binding motif is required for apical localization at epithelial and endothelial tight junctions. *Eur J Cell Biol*, *83*(4), 135-144. doi:10.1078/0171-9335-00366
- Sagona, A. P., Nezis, I. P., Pedersen, N. M., Liestøl, K., Poulton, J., Rusten, T. E., Stenmark, H. (2010). PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat Cell Biol*, *12*(4), 362-371. doi:10.1038/ncb2036
- Salzer, J. L. (2003). Polarized domains of myelinated axons. *Neuron*, *40*(2), 297-318.

- Samson, R. Y., Obita, T., Freund, S. M., Williams, R. L., & Bell, S. D. (2008). A role for the ESCRT system in cell division in archaea. *Science*, *322*(5908), 1710-1713. doi:10.1126/science.1165322
- Schiel, J. A., Simon, G. C., Zaharris, C., Weisz, J., Castle, D., Wu, C. C., & Prekeris, R. (2012). FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis. *Nat Cell Biol*, *14*(10), 1068-1078. doi:10.1038/ncb2577
- Schneeberger, E. E., & Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, *286*(6), C1213-1228. doi:10.1152/ajpcell.00558.2003
- Schroeder, T. E. (1968). Cytokinesis: filaments in the cleavage furrow. *Exp Cell Res*, *53*(1), 272-276.
- Schroeder, T. E. (1990). The contractile ring and furrowing in dividing cells. *Ann N Y Acad Sci*, *582*, 78-87.
- Schulte, J., Tepass, U., & Auld, V. J. (2003). Gliotactin, a novel marker of tricellular junctions, is necessary for septate junction development in *Drosophila*. *J Cell Biol*, *161*(5), 991-1000. doi:10.1083/jcb.200303192
- Scott, A., Chung, H. Y., Gonciarz-Swiatek, M., Hill, G. C., Whitby, F. G., Gaspar, J., Sundquist, W. I. (2005). Structural and mechanistic studies of VPS4 proteins. *EMBO J*, *24*(20), 3658-3669. doi:10.1038/sj.emboj.7600818
- Sherman, S., Kirchenbuechler, D., Nachmias, D., Tamir, A., Werner, S., Elbaum, M., & Elia, N. (2016). Resolving new ultrastructural features of cytokinetic abscission with soft-X-ray cryo-tomography. *Sci Rep*, *6*, 27629. doi:10.1038/srep27629
- Shiflett, S. L., Ward, D. M., Huynh, D., Vaughn, M. B., Simmons, J. C., & Kaplan, J. (2004). Characterization of Vta1p, a class E Vps protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, *279*(12), 10982-10990. doi:10.1074/jbc.M312669200
- Skaer, H. B., Maddrell, S. H., & Harrison, J. B. (1987). The permeability properties of septate junctions in Malpighian tubules of *Rhodnius*. *J Cell Sci*, *88* (Pt 2), 251-265.
- Slagsvold, T., Aasland, R., Hirano, S., Bache, K. G., Raiborg, C., Trambaiolo, D., Stenmark, H. (2005). Eap45 in mammalian ESCRT-II binds ubiquitin via a phosphoinositide-interacting GLUE domain. *J Biol Chem*, *280*(20), 19600-19606. doi:10.1074/jbc.M501510200
- Snow, P. M., Bieber, A. J., & Goodman, C. S. (1989). Fasciclin III: a novel homophilic adhesion molecule in *Drosophila*. *Cell*, *59*(2), 313-323.
- Staehein, L. A. (1973). Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci*, *13*(3), 763-786.
- Steed, E., Balda, M. S., & Matter, K. (2010). Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol*, *20*(3), 142-149. doi:10.1016/j.tcb.2009.12.002
- Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M. H., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., & Gerlich, D. W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell*, *136*(3), 473-484.

- doi:10.1016/j.cell.2008.12.020
- Subramanian, R., Wilson-Kubalek, E. M., Arthur, C. P., Bick, M. J., Campbell, E. A., Darst, S. A., Kapoor, T. M. (2010). Insights into antiparallel microtubule crosslinking by PRC1, a conserved nonmotor microtubule binding protein. *Cell*, 142(3), 433-443. doi:10.1016/j.cell.2010.07.012
- Suzuki, A., Hirata, M., Kamimura, K., Maniwa, R., Yamanaka, T., Mizuno, K., Ohno, S. (2004). aPKC acts upstream of PAR-1b in both the establishment and maintenance of mammalian epithelial polarity. *Curr Biol*, 14(16), 1425-1435. doi:10.1016/j.cub.2004.08.021
- Suzuki, H., Nishizawa, T., Tani, K., Yamazaki, Y., Tamura, A., Ishitani, R., Fujiyoshi, Y. (2014). Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science*, 344(6181), 304-307. doi:10.1126/science.1248571
- Syed, M. H., Krudewig, A., Engelen, D., Stork, T., & Klämbt, C. (2011). The CD59 family member Leaky/Coiled is required for the establishment of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *J Neurosci*, 31(21), 7876-7885. doi:10.1523/JNEUROSCI.0766-11.2011
- Tamura, A., & Tsukita, S. (2014). Paracellular barrier and channel functions of TJ claudins in organizing biological systems: advances in the field of barrierology revealed in knockout mice. *Semin Cell Dev Biol*, 36, 177-185. doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.019
- Tanentzapf, G., & Tepass, U. (2003). Interactions between the crumbs, lethal giant larvae and bazooka pathways in epithelial polarization. *Nat Cell Biol*, 5(1), 46-52. doi:10.1038/ncb896
- Tempesta, C., Hijazi, A., Moussian, B., & Roch, F. (2017). Boudin trafficking reveals the dynamic internalisation of specific septate junction components in *Drosophila*. *PLoS One*, 12(10), e0185897. doi:10.1371/journal.pone.0185897
- Teo, H., Perisic, O., González, B., & Williams, R. L. (2004). ESCRT-II, an endosome-associated complex required for protein sorting: crystal structure and interactions with ESCRT-III and membranes. *Dev Cell*, 7(4), 559-569. doi:10.1016/j.devcel.2004.09.003
- Tepass, U., & Hartenstein, V. (1994a). Epithelium formation in the *Drosophila* midgut depends on the interaction of endoderm and mesoderm. *Development*, 120(3), 579-590.
- Tepass, U., & Hartenstein, V. (1994b). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol*, 161(2), 563-596. doi:10.1006/dbio.1994.1054
- Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R., & Fehon, R. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet*, 35, 747-784. doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.091415
- Terry, S. J., Zihni, C., Elbediwy, A., Vitiello, E., Leefa Chong San, I. V., Balda, M. S., & Matter, K. (2011). Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and

- morphogenesis. *Nat Cell Biol*, 13(2), 159-166. doi:10.1038/ncb2156
- Thieleke-Matos, C., Osório, D. S., Carvalho, A. X., & Morais-de-Sá, E. (2017). Emerging Mechanisms and Roles for Asymmetric Cytokinesis. *Int Rev Cell Mol Biol*, 332, 297-345. doi:10.1016/bs.ircmb.2017.01.004
- Théry, M., & Bornens, M. (2006). Cell shape and cell division. *Curr Opin Cell Biol*, 18(6), 648-657. doi:10.1016/j.ceb.2006.10.001
- Tiklová, K., Senti, K. A., Wang, S., Gräslund, A., & Samakovlis, C. (2010). Epithelial septate junction assembly relies on melanotransferrin iron binding and endocytosis in *Drosophila*. *Nat Cell Biol*, 12(11), 1071-1077. doi:10.1038/ncb2111
- Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L. O., Conway, D. E., Randi, A. M., Balda, M. S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J Cell Biol*, 208(6), 821-838. doi:10.1083/jcb.201404140
- Wallace, S. W., Durgan, J., Jin, D., & Hall, A. (2010). Cdc42 regulates apical junction formation in human bronchial epithelial cells through PAK4 and Par6B. *Mol Biol Cell*, 21(17), 2996-3006. doi:10.1091/mbc.E10-05-0429
- Wang, S., & Zheng, Y. (2011). Identification of a novel dynein binding domain in nudel essential for spindle pole organization in *Xenopus* egg extract. *J Biol Chem*, 286(1), 587-593. doi:10.1074/jbc.M110.181578
- Wang, Y. C., Khan, Z., Kaschube, M., & Wieschaus, E. F. (2012). Differential positioning of adherens junctions is associated with initiation of epithelial folding. *Nature*, 484(7394), 390-393. doi:10.1038/nature10938
- Ward, R. E., Lamb, R. S., & Fehon, R. G. (1998). A conserved functional domain of *Drosophila* coracle is required for localization at the septate junction and has membrane-organizing activity. *J Cell Biol*, 140(6), 1463-1473.
- Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*, 1(3), 136-143. doi:10.1038/11056
- Watanabe, S., Ando, Y., Yasuda, S., Hosoya, H., Watanabe, N., Ishizaki, T., & Narumiya, S. (2008). mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells. *Mol Biol Cell*, 19(5), 2328-2338. doi:10.1091/mbc.E07-10-1086
- Wells, R. E., Barry, J. D., Warrington, S. J., Cuhlmann, S., Evans, P., Huber, W., Zeidler, M. P. (2013). Control of tissue morphology by Fasciclin III-mediated intercellular adhesion. *Development*, 140(18), 3858-3868. doi:10.1242/dev.096214
- Wheatley, S. P., Hinchcliffe, E. H., Glotzer, M., Hyman, A. A., Sluder, G., & Wang, Y. (1997). CDK1 inactivation regulates anaphase spindle dynamics and cytokinesis in vivo. *J Cell Biol*, 138(2), 385-393.
- Whitlock, K. E. (1993). Development of *Drosophila* wing sensory neurons in mutants with missing or modified cell surface molecules. *Development*, 117(4), 1251-1260.
- Woods, D. F., & Bryant, P. J. (1991). The discs-large tumor suppressor gene of

- Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell*, 66(3), 451-464.
- Wu, J. Q., & Pollard, T. D. (2005). Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast. *Science*, 310(5746), 310-314. doi:10.1126/science.1113230
- Wu, V. M., Schulte, J., Hirschi, A., Tepass, U., & Beitel, G. J. (2004). Sinuous is a Drosophila claudin required for septate junction organization and epithelial tube size control. *J Cell Biol*, 164(2), 313-323. doi:10.1083/jcb.200309134
- Wu, V. M., Yu, M. H., Paik, R., Banerjee, S., Liang, Z., Paul, S. M., Beitel, G. J. (2007). Drosophila Varicose, a member of a new subgroup of basolateral MAGUKs, is required for septate junctions and tracheal morphogenesis. *Development*, 134(5), 999-1009. doi:10.1242/dev.02785
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., & Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*, 123(5), 889-901. doi:10.1016/j.cell.2005.09.020
- Yamagata, M., & Sanes, J. R. (2008). Dscam and Sidekick proteins direct lamina-specific synaptic connections in vertebrate retina. *Nature*, 451(7177), 465-469. doi:10.1038/nature06469
- Yamagata, M., Weiner, J. A., & Sanes, J. R. (2002). Sidekicks: synaptic adhesion molecules that promote lamina-specific connectivity in the retina. *Cell*, 110(5), 649-660.
- Yamanaka, T., Horikoshi, Y., Sugiyama, Y., Ishiyama, C., Suzuki, A., Hirose, T., Ohno, S. (2003). Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity. *Curr Biol*, 13(9), 734-743.
- 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. *Nat Struct Mol Biol*, 15(12), 1278-1286. doi:10.1038/nsmb.1512
- Yonemura, S. (2011). Cadherin-actin interactions at adherens junctions. *Curr Opin Cell Biol*, 23(5), 515-522. doi:10.1016/j.ceb.2011.07.001
- Yu, Z., Gonciarz, M. D., Sundquist, W. I., Hill, C. P., & Jensen, G. J. (2008). Cryo-EM structure of dodecameric Vps4p and its 2:1 complex with Vta1p. *J Mol Biol*, 377(2), 364-377. doi:10.1016/j.jmb.2008.01.009
- Yüce, O., Piekny, A., & Glotzer, M. (2005). An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol*, 170(4), 571-582. doi:10.1083/jcb.200501097
- Zhu, C., Lau, E., Schwarzenbacher, R., Bossy-Wetzel, E., & Jiang, W. (2006). Spatiotemporal control of spindle midzone formation by PRC1 in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(16), 6196-6201. doi:10.1073/pnas.0506926103
- Zihni, C., Balda, M. S., & Matter, K. (2014). Signalling at tight junctions during epithelial differentiation and microbial pathogenesis. *J Cell Sci*, 127(Pt 16),

3401-3413. doi:10.1242/jcs.145029
Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 17(9), 564-580. doi:10.1038/nrm.2016.80