



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : *Cancérologie*

Présentée et soutenue par *Chantal Roubinet*
Le 30 septembre 2011

Titre : *Rôles et régulation du PI(4,5)P2 dans le remodelage cortical
et la morphogénèse cellulaire en mitose.*

Jury :

Pr. Bernard Payrastra, Président UPS
Pr. Marc Therrien, Président UdeM et Rapporteur UPS
Dr. Yohanns Bellaïche, Rapporteur UPS et Examineur externe UdeM
Dr. Matthieu Piel, Rapporteur UPS et Examineur externe UdeM
Dr. François Payre, Directeur de thèse UPS et Examineur UPS
Dr. Sébastien Carréno, Directeur de thèse UdeM et Examineur UPS
Dr. Andréas Merdes, Examineur UPS

Ecole doctorale : *Biologie, Santé et Biotechnologies*
Unité de recherche : *Centre de Biologie du Développement*
Directeur(s) de Thèse : *Dr. François Payre, Dr. Sébastien Carréno*
Rapporteurs : *Pr. Marc Therrien, Dr. Yohanns Bellaïche, Dr. Matthieu Piel*



**Rôles et régulation du PI(4,5)P2 dans le remodelage
cortical et la morphogénèse cellulaire en mitose**

par

Chantal ROUBINET

Département de Biologie moléculaire

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Thèse présentée à l'Université de Montréal

en vue de l'obtention du grade de docteur

en Biologie Moléculaire

Septembre 2011

Université de Montréal (UdeM) et Université de Toulouse Paul Sabatier (UPS)

Cette thèse intitulée :

**Rôles et régulation du PI(4,5)P2 dans le remodelage cortical
et la morphogénèse cellulaire en mitose**

Présentée par :

ROUBINET Chantal

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Bernard PAYRASTRE

Président du Jury de l'Université Paul Sabatier

Pr. Marc THERRIEN

Président du Jury de l'Université de Montréal et Rapporteur UPS

Dr. Yohanns BELLAÏCHE

Rapporteur UPS et Examineur externe UdeM

Dr. Matthieu PIEL

Rapporteur UPS et Examineur externe UdeM

Dr. Sébastien CARRENO

Directeur de thèse UdeM et Examineur UPS

Dr. François PAYRE

Directeur de thèse UPS et Examineur UPS

Dr. Andréas MERDES

Examineur UPS

Résumé des travaux de thèse.

La division cellulaire est un événement fondamental, indispensable au développement embryonnaire animal et à l'homéostasie des organismes adultes. Il s'agit d'un processus complexe qui doit être précisément contrôlé dans le temps et l'espace pour permettre la formation de deux cellules filles, au contenu génétique identique à celui de la cellule mère. Ceci requiert une coordination entre la ségrégation des chromosomes, opérée par les microtubules, et le clivage de la cellule, engageant une réorganisation dynamique du cytosquelette d'Actine. La modification de la forme des cellules en cours de division est en effet due au remodelage du cortex cellulaire, incluant la membrane plasmique et le réseau de filaments d'Actine sous-jacent. Bien que cette série de modifications du cortex soit indispensable au déroulement correct de la division cellulaire, les mécanismes moléculaires du contrôle l'organisation corticale en mitose restent mal caractérisés.

Le PI(4,5)P2 est un phosphoinositide constituant de la membrane plasmique, notamment nécessaire à la division cellulaire. Nos travaux chez la drosophile mettent en évidence que ce phospholipide présente une distribution dynamique, homogène sur l'ensemble du cortex à l'entrée en mitose, puis se concentrant à l'équateur des cellules après la séparation des deux lots de chromosomes. Nous montrons que le PI(4,5)P2 est nécessaire au contrôle de la stabilité corticale et du fuseau mitotique, au moins en partie par son rôle favorisant l'activation de la dMoésine. La dMoésine régule l'interaction entre les filaments d'Actine et la membrane plasmique, jouant un rôle clé dans l'organisation locale du cortex des cellules en mitose et ses propriétés mécaniques. Nous montrons que l'interaction PI(4,5)P2/dMoésine participe à la contraction cellulaire à l'entrée en mitose, puis à l'élongation cellulaire caractéristique des étapes plus tardives de la division. A la fin de la mitose, nous montrons que la phosphatase pP1-87B inhibe l'activation de la dMoésine, indispensable à la relaxation du cortex des cellules en interphase.

Par un crible fonctionnel systématique, nous avons recherché l'ensemble des facteurs indispensables à la production et à l'enrichissement localisé du PI(4,5)P2 au cortex mitotique. Nous montrons le rôle majeur de deux voies de biosynthèse, qui collaborent pour produire localement le PI(4,5)P2 à la membrane plasmique au cours de la mitose. Leur absence prévient l'activation et le recrutement membranaire de la dMoésine, et conduit à une instabilité corticale associée à des défauts du fuseau mitotique. Une troisième voie, nécessitant l'activité de la protéine dOcr1, contribue à l'homéostasie de ce phosphoinositide, en dégradant le PI(4,5)P2 présent sur les membranes internes de la cellule. L'inactivation de dOcr1 empêche la formation normale et l'ingression du sillon de clivage.

Ensemble, ces résultats identifient donc des régulateurs importants de la membrane plasmique et de son interaction avec le cytosquelette, permettant de mieux comprendre les mécanismes de la réorganisation de la forme cellulaire au cours de la mitose.

Mots clefs.

Mitose, Morphogénèse cellulaire, Cortex, Cytosquelette, PI(4,5)P2, dMoésine, Skittles, Pten, Ocr1

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du Jury qui m'ont fait l'honneur de lire et de juger ce travail.

*Le **Pr. Bernard Payraastre**, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse, ainsi que pour votre collaboration concernant le dosage métabolique des phosphoinositides. J'ai beaucoup apprécié toutes les discussions que nous avons eu, et notamment vos conseils scientifiques pertinents concernant l'étude des phosphoinositides. Merci également pour vos lettres de référence.*

*Le **Pr. Marc Therrien**, pour avoir accepté de présider ce jury en tant que représentant de l'Université de Montréal, et d'examiner ce travail de thèse en tant que rapporteur de l'Université Paul Sabatier. Un grand merci pour l'aide que vous m'avez apportée à l'IRIC, entre autres lorsque je devais assurer simultanément un module et l'examen pré-doctoral. Je n'oublierai pas non plus toutes vos qualités, tant scientifiques qu'humaines, ni vos critiques toujours constructives sur mon projet de recherche qui m'ont beaucoup aidées lors des fly meeting. Enfin, un grand merci pour votre soutien dans mes demandes de financement en vu du post-doctorat, je vous en suis très reconnaissante.*

*Le **Dr. Yohanns Bellaïche**, pour avoir accepté d'être rapporteur et pour la discussion intéressante qui a suivi la soutenance. Je retiendrai entre autres que les mécanismes impliqués dans l'orientation du fuseau mitotique dans le cadre de la division asymétrique ne sont pas incompris, bien au contraire.... ☺*

*Le **Dr. Matthieu Piel**, pour avoir accepté d'être rapporteur. J'ai beaucoup apprécié la discussion qui a suivi la soutenance, et plus particulièrement la discussion sur les mécanismes induisant la formation des blebs. Merci aussi pour tous vos conseils, tels que l'utilisation d'un milieu légèrement hypotonique pour favoriser le blebbing des S2.*

*Le **Dr. Andréas Merdes**, pour avoir accepté d'être examinateur. Un grand merci pour toutes vos critiques sur le papier dMoésine, qui ont fortement contribué à l'améliorer. Je vous suis également très reconnaissante de l'aide que vous m'avez apportée, par exemple en contactant directement des directeurs d'équipes que je souhaitais intégrer pour le post-doctorat. Un grand merci également pour vos lettres de recommandation, je n'oublierai pas non plus votre soutien pour mes demandes de financement.*

*Le **Dr. François Payre**, directeur de thèse, pour m'avoir soutenu durant ces 4 années de thèse. Merci pour ta forte implication dans l'écriture du papier dMoésine, pour m'avoir permis d'assister au meeting de l'ASCB cette année, bref, la liste est longue, pour tout ce que tu as fait pour moi (y compris veiller jusqu'à 5h du matin pour me corriger un manuscrit de thèse rendu un peu tardivement...).*

*Le **Dr. Sébastien Carréno**, directeur de thèse, pour ton encadrement scientifique tant théorique que technique en DEA et première partie de thèse. Merci pour m'avoir appris les techniques de Biologie Moléculaire et Cellulaire, et surtout pour m'avoir fait découvrir les joies de la microscopie. Sur un plan plus personnel, travailler dans ton équipe m'a permis de découvrir le Québec en effectuant une partie de ma thèse dans cette fabuleuse province.*

Enfin, je tiens à remercier une nouvelle fois l'ensemble des membres du jury pour la discussion très enrichissante qui a suivi la soutenance.

Je souhaiterais également remercier l'ensemble des membres de l'équipe des Dr. François Payre / Serge Plaza. **Serge**, un grand merci pour ton soutien, très humain, tu as toujours eu de bons conseils à donner (excepté peut-être sur les pistes de ski, « Target Locked », si tu vois ce que je veux dire...). Je garderai aussi un bon souvenir de l'heure qui a suivi le saut en chute libre.... Je tiens également à exprimer ma gratitude à **Pierre**, non seulement pour ses conseils scientifiques, mais aussi pour son aide dans la rédaction de la thèse. Je remercie également **Hélène C**, les deux droguées du chocolat **Delphine** et **Emilie**, **Phiphi**, **Yvan**, **Ahmad**, **Jenny**, **Hélène F** et **Isa**.

Je n'oublie pas non plus **Barbara** et **Sara**, de l'autre côté de l'Atlantique, sans vous ma thèse n'aurait probablement pas été aussi joyeuse. **Xavier**, je te remercie pour tous ces délires, la journée au ski par -35 °C et ces dimanches au labo qui se terminaient par un brunch au St-Denis, sans oublier notre abonnement au Mc Carold, que de bons souvenirs...

De nouveau à Toulouse, je tiens à remercier « mes équipes adoptives », celle d'**Andréas Merdes** et celle de **Sylvie Tournier** et **Yannick Gachet**. Un grand merci pour toutes ces discussions en Club Cytosquelette que j'attendais (et attends toujours) impatiemment chaque mois, afin d'entendre parler de division, d'actine et de microtubules. Merci à vous tous, **Brigitte**, **Sylvie** et **Yannick**, pour votre aide dans les moments moins faciles.

Merci aussi à **Ewa Paluch**, pour avoir accepté de collaborer et m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant un mois. Merci beaucoup pour toute votre aide tant expérimentale que théorique, j'ai beaucoup apprécié cette expérience et rencontrer l'ensemble des membres de votre équipe.

Je tiens également à remercier les responsables des plateformes de microscopie au Centre de Biologie du Développement ainsi qu'à l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie, qui m'ont permis de mener à bien mes expériences de vidéo-microscopie, tout en y prenant plaisir. **Brice**, merci beaucoup pour ne plus fuir quand tu me vois arriver au champ large avec mes gigas de données... Promis, lundi je fais de la place sur le disque dur... (j'attends toujours ton mojito...). **Aurélié**, merci pour ces petites nocturnes à réparer le DG4. Je me souviens aussi de ce virage parfait qui s'est terminé dans un canon à neige, fallait le faire tu l'as fait, respect ☺. De nouveau de l'autre côté de l'Atlantique, je remercie **Jonas** pour avoir fait preuve d'une grande honnêteté à mon égard, ainsi que pour mon accès un peu privilégié au Delta Vision ☺. Enfin, je remercie **Christian Charbonneau** pour sa grande disponibilité et surtout sa grande gentillesse.

Je souhaiterais également remercier le **Dr. Pierre Thibault**, le **Dr. Paul Maddox**, le **Dr. Amy Maddox**, le **Dr. Grégory Emery**, le **Dr. Vincent Archambault**, le **Dr. Benjamin Kowk**, le **Dr. Jean-Claude Labbé**, le **Dr. Marc Therrien** et l'ensemble de leurs équipes pour leur bonne humeur et leurs conseils quotidiens.

Pour terminer, je tiens à remercier ma famille, et plus particulièrement mes parents et mon frère qui ont toujours été à mes côtés. Toujours de bonne humeur et présents, même à distance, ils m'ont été d'un grand réconfort et ont à ce titre fortement contribué à la réalisation de ce doctorat. Enfin, merci à **Junior**, **Etienne**, **Zool**, **Sozig**, **Juju**, **Amélie** et **Elodie**.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations.....	p.9
Orthologues <i>D.melanogaster</i> / <i>H.sapiens</i>	p.10
Préface.....	p.11
Introduction.....	p.14
<u>I. La mitose.</u>	p.15
11. La prophase.....	p.17
12. La prométaphase.....	p.17
13. La métaphase.....	p.18
14. L'anaphase.....	p.19
15. La télophase.....	p.20
16. La mitose : une chorégraphie dynamique	p.20
<u>II. Deux composantes du cytosquelette au cœur de la mitose, l'Actine filamenteuse et les microtubules.</u>	p.21
21. Dynamique de l'Actine et régulateurs principaux	p.21
211. La dynamique de polymérisation de l'Actine <i>in vitro</i>	p.21
212. Régulation de l'Actine filamenteuse <i>in vivo</i>	p.22
213. L'Actomyosine.....	p.23
22. Dynamique des microtubules et principaux régulateurs.....	p.25
221. Régulation du réseau microtubulaire au cours du cycle cellulaire.....	p.25
222. Structure et constituants des microtubules.....	p.26
223. Protéines MAP, facteurs de catastrophe et protéines motrices.....	p.28
23. Quand l'Actine et les microtubules communiquent.....	p.29
<u>III. Morphogénèse cellulaire des cellules en mitose.</u>	p.29
31. L'arrondissement cellulaire à la transition interphase-mitose.....	p.30
311. Une caractéristique générale des cellules animales ?.....	p.30
312. L'importance de l'arrondissement pour la division cellulaire.....	p.31

313. L'arrondissement cellulaire : un processus complexe et régulé.....	p.32
3131. La ré-organisation du cytosquelette d'Actine.....	p.32
3132. Réorganisation de l'Actine Rho-dépendante.....	p.33
3133. Réorganisation de l'Actine Rho-indépendante.....	p.34
32. L'élongation cellulaire caractéristique de l'anaphase B précoce :	
les acteurs moléculaires.....	p.34
33. Contraction équatoriale et relaxation polaire en anaphase B.....	p.37
331. Modèle de contraction équatoriale et de relaxation polaire médiées	
par le fuseau mitotique.	p.37
3311. Modèle de contraction équatoriale chez les mammifères.....	p.37
3312. Modèle de contraction équatoriale chez la drosophile.....	p.39
3313. Combinaison de signaux positifs et négatifs.....	p.39
332. Modèle de contraction équatoriale et de relaxation polaire médiées	
par un flux cortical d'Actine et de Myosine.....	p.40
333. Les blebs polaires : des déformations furtives et dynamiques.	p.41

IV. Les protéines ERMs et leur(s) rôle(s) dans la polarité et la morphogénèse cellulaire... p.43

41. Des cellules de drosophile pour étudier les protéines ERMs.....	p.43
42. Activation des ERMs et modification conformationnelle.....	p.44
421. Structure des protéines ERMs.....	p.44
422. L'activation des protéines ERMs, un processus en plusieurs étapes.....	p.45
43. Les ERMs, des régulateurs de la polarité corticale et de la morphogénèse.....	p.46

V. Importance des membranes et du PI(4,5)P2 dans le processus mitotique. p.48

51. Quand la fusion orientée de vésicules avec la membrane plasmique	
participe à l'ingression du sillon de clivage.....	p.48
511. Fusion membranaire lors de la 1ère mitose de l'embryogénèse.....	p.48
512. Rôles des fusions membranaire dans la division cellulaire.....	p.49
52. Régulation du PI(4,5)P2 en interphase et en mitose.....	p.51
53. Le PI(4,5)P2 contribue à la dynamique de l'anneau contractile.....	p.52

Objectifs et stratégies expérimentales des travaux..... p.54

Résultats..... p.56

I. En participant à la régulation de la dMoésine, le PI(4,5)P2 contribue à l'homéostasie tissulaire au cours du développement..... p.57

- Résumé..... p.58
- Article: Differential roles of PtdIns(4,5)P2 and phosphorylation in Moesin activation during Drosophila development..... p.59

II. En intégrant deux réseaux de signalisation PI(4,5)P2 – dépendant et Slik/Pp1-87B - dépendant, la dMoésine participe à la morphogénèse cellulaire des cellules mitotiques. p.60

- Résumé..... p.61
- Article: Molecular networks driving remodelling of the cell cortex during mitosis..... p.63
- Discussion..... p.64

III. En contrôlant l'homéostasie du PI(4,5)P2, dOcr1 favorise la contraction équatoriale et participe ainsi à la morphogénèse cellulaire des cellules mitotiques. p.80

- Résumé..... p.81
- Article: The Inositol 5-phosphatase dOcr1 controls PI(4,5)P2 homeostasis and is necessary for cytokinesis..... p.82
- Discussion..... p.83

Conclusion / Discussion..... p.92

I. Dynamique de distribution du PI(4,5)P2 en mitose et mécanismes de régulation..... p.93

- *La dynamique de distribution du PI(4,5)P2 en mitose est-elle évolutivement conservée ?..... p.94*
- *Quelles sont les voies de signalisation ou les mécanismes moléculaires responsables de la régulation du taux de PI(4,5)P2 et de sa distribution dans les cellules mitotiques ? p.94*

II. Mise en évidence de nouveaux rôles du PI(4,5)P2 dans le processus mitotique..... p.95

- *L'anisotropie de distribution du PI(4,5)P2 participe à la création d'un différentiel de plasticité corticale. p.96*
- *Le PI(4,5)P2 contribue-t-il à l'orientation et au centrage du fuseau mitotique ? p.98*

III. Régulation du PI(4,5)P2 et des protéines ERMs dans l'organisme p.99

- *La liaison au PI(4,5)P2 et la phosphorylation de la thréonine 559 permettent-elles de moduler différemment l'activité de la dMoésine ?..... p.99*
- *En quoi est-il important de mieux comprendre les mécanismes de régulation et les rôles fonctionnels du PI(4,5)P2 et des protéines ERMs in vivo ?..... p.100*

IV. Critiques de mon projet de recherche. p.101

- *Mieux caractériser les contributions respectives de la kinase Slik et du PI(4,5)P2 dans la localisation corticale de la dMoésine..... p.101*
- *Ajouter une dimension quantitative à notre modèle, présentement qualitatif, aurait probablement augmenté l'impact de nos découvertes relatives à la formation de gradients protéiques et lipidiques..... p.104*

V. Perspectives. p.107

- *Par quel(s) mécanisme(s) les protéines ERM participent-elles à l'orientation du fuseau mitotique, à sa stabilisation et à son positionnement au centre de la cellule ? p.107*
- *Identification et caractérisation de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la formation et/ou la rétraction des blebs mitotiques..... p.108*

Références..... p.113

Liste des abréviations.

ADF:	<u>A</u> ctin <u>D</u> epolymerization <u>F</u> actor
ADN:	<u>A</u> cide <u>D</u> ésoxyribo <u>n</u> ucléique
ADP:	<u>A</u> denosine <u>D</u> iphosphate
ARN:	<u>A</u> cide <u>R</u> ibo <u>n</u> ucléique
ATP:	<u>A</u> denosine <u>T</u> riphosphate
DAG:	<u>D</u> ia <u>c</u> ylglycerol
ERM:	<u>E</u> zrin <u>R</u> adixin <u>M</u> oesin
FACS:	<u>F</u> luorescence <u>A</u> ctivated <u>C</u> ell <u>S</u> orting
FERM:	<u>F</u> our-point-one <u>E</u> zrin <u>R</u> adixin <u>M</u> oesin
FMA:	<u>F</u> urrow <u>M</u> icrotubule <u>A</u> rray
GAPs:	<u>G</u> TPase <u>A</u> ctivating <u>P</u> roteins
GDIs:	<u>G</u> uanine nucleotide <u>D</u> issociation <u>I</u> nhibitors
GDP:	<u>G</u> uanosine <u>D</u> iphosphate
GEFs:	<u>G</u> uanine nucleotide <u>E</u> xchange <u>F</u> actors
GTP:	<u>G</u> uanosine <u>T</u> riphosphate
IP3:	<u>I</u> nositol 1,4,5- <u>T</u> riphosphate
MAPs:	<u>M</u> icrotubules <u>A</u> ssociated <u>P</u> roteins
MLC:	<u>M</u> yosin regulatory <u>L</u> ight <u>C</u> hain
MLCK:	<u>M</u> yosin regulatory <u>L</u> ight <u>C</u> hain <u>K</u> inase
MTOC:	<u>M</u> icrotubule- <u>O</u> rganizing <u>C</u> enter
PH:	<u>P</u> lekstrin- <u>H</u> omology
PI(4)P :	<u>P</u> hosphatidy <u>I</u> nositol <u>4</u> - <u>P</u> hosphate
PI(4,5)P2 :	<u>P</u> hosphatidy <u>I</u> nositol <u>4,5</u> -bisphosphate
PI(3,4,5)P3 :	<u>P</u> hosphatidy <u>I</u> nositol <u>3,4,5</u> -triphosphate
PLC:	<u>P</u> hospholipase <u>C</u>

Orthologues *D.melanogaster* / *H.sapiens*.

D.melanogaster	H.sapiens	Famille
Alpha-Tubuline	Alpha-Tubuline	Tubuline
Béta-Tubuline	Béta-Tubuline	Tubuline
Citron	Citron	Sérine / Thréonine Kinase
Diaphanous	mDiaphanous	Formine
dMoésine	Ezrine	ERM
	Radixine	ERM
	Moésine	ERM
dOcr1	Ocr1	Inositol-5 Phosphatase
	Inpp5b	Inositol-5 Phosphatase
Four wheel drive	PI4K béta	PI-4 Kinase
P190RhoGAP	Rho GAP p190A	Rho-GAP
Pavarotti	MKLP1	Kinésine
Pebble	ECT2	Rho-GEF
Pp1-87B	PP1-alpha	Sérine / Thréonine Phosphatase
	PP1-gamma	Sérine / Thréonine Phosphatase
Pten	Pten	PI(3,4,5)P3-3 Phosphatase
Rab35	Rab35	GTPase
RacGAP50C	MgcRacGAP	Rho-GAP
Rho1	RhoA	GTPase
Rho-kinase	Rho-kinase	Kinase
Skittles	PIP5K-1 alpha	PI(4)P-5 Kinase
	PIP5K-1 béta	PI(4)P-5 Kinase
	PIP5K-1 gamma	PI(4)P-5 Kinase
Slik	STK10	Sérine / Thréonine Kinase
Spaghetti squash	MLC	Myosine II
Zipper	MYH10	Myosine II

PREFACE

Notre équipe s'intéresse aux mécanismes moléculaires qui contrôlent le changement de forme cellulaire, la morphogénèse, principalement au cours de l'embryogenèse chez la drosophile. La fonction de chacune de nos cellules requiert en effet une organisation tridimensionnelle spécifique. La différenciation terminale des différents tissus embryonnaires inclut souvent un remodelage stéréotypé de la forme cellulaire, bien illustré par la morphogénèse des cellules épidermiques, le principal modèle d'étude de l'équipe. Si l'importance du cytosquelette cellulaire est bien établie, un enjeu majeur est d'identifier la nature et le rôle des facteurs qui régulent son organisation pour la morphogénèse. Une question importante est de mieux comprendre le dialogue entre le cytosquelette et la membrane plasmique, constituant ensemble le cortex des cellules. Au delà de la différenciation terminale, la réorganisation du cortex est un élément clé de la série des changements de forme qui caractérise la division cellulaire. Bien que le déroulement de cette « morphogénèse » apparaisse bien conservé pour toutes les cellules animales, les mécanismes sous-jacents restent cependant mal connus. L'objectif de mes travaux de thèse a été de contribuer à mieux comprendre le contrôle de l'organisation du cortex cellulaire au cours de la mitose. J'ai développé pour cela des approches fonctionnelles systématiques, qui couplées à l'imagerie sur cellules vivantes, ont permis de dresser une image dynamique du rôle et de la régulation de l'interaction cytosquelette/membrane au cours de la division cellulaire.

Lors de mon arrivée au laboratoire, Sébastien Carréno, alors chercheur post-doctoral dans l'équipe de François Payre, venait de mettre en évidence le rôle de la dMoésine, un régulateur du cytosquelette, au cours de la division cellulaire. La dMoésine est l'unique représentant chez la drosophile de la famille des protéines Ezrine, Radixine, Moesine (ERM), connues pour réguler l'interaction entre les filaments d'Actine et la membrane plasmique [2]. La relative simplicité du génome de la drosophile facilite donc l'analyse du répertoire fonctionnel des protéines ERMs. Ainsi, les travaux réalisés révélaient l'importance de la dMoésine pour le contrôle de la forme cellulaire au cours de la mitose. De plus, cette étude montrait la dynamique d'activation locale de la dMoésine à travers le cycle cellulaire et identifiait la Kinase Slik comme un acteur majeur de l'activation de la dMoésine en mitose. La dMoésine, et son activation locale, est nécessaire au déroulement de la division cellulaire ; son absence altère l'organisation du cortex cellulaire et provoque des défauts spectaculaires de la forme des cellules et de l'organisation du fuseau mitotique.

Parmi les questions ouvertes par ces résultats, j'ai voulu mieux comprendre les fonctions de la dMoésine dans l'organisation du cortex cellulaire. D'autre part, les travaux, menés dans l'équipe par Fernando Roch et Cédric Polesello montraient l'importance d'un

phosphoinositide, le PI(4,5)P2, dans l'activation de la dMoésine *in vivo* [3]. J'ai donc décidé de tester son rôle au cours de la division, de manière systématique, et en parallèle de rechercher des régulateurs, positifs ou négatifs, de la dMoésine durant la mitose. Les données acquises nous ont permis de mieux comprendre le rôle et la régulation de la dMoésine au cours de la division cellulaire, ainsi qu'étendre l'importance fonctionnelle du PI(4,5)P2 pour la division et de mieux caractériser la régulation de sa production.

L'introduction de ce manuscrit rappelle brièvement les caractéristiques majeures des phases de la mitose, et précise les critères que nous avons utilisés pour les différencier. Puis dans une seconde partie nous verrons les filaments d'Actine et les microtubules, dont la réorganisation coordonnée est fondamentale à la division, avec leur structure, leur dynamique et leurs mécanismes régulateurs afin de mieux présenter les étapes de la transformation de la forme des cellules mitotiques qui sera l'objet de la troisième partie. Celle-ci constitue le cœur de cette introduction, présentant la littérature traitant des mécanismes impliqués dans le remodelage cortical des cellules mitotiques. Sans viser à l'exhaustivité, nous nous concentrerons sur les principaux acteurs et voies de signalisation qui y contribuent. Dans les deux dernières parties, nous aborderons la régulation des protéines ERMs et leur implication dans la morphogénèse cellulaire en général puis les rôles connus du PI(4,5)P2 dans le processus mitotique.

La partie résultats se compose d'un article auquel j'ai collaboré, ainsi que de deux articles qui représentent la majeure partie de mes travaux de thèse. La section conclusion tentera de replacer ces résultats, et leur portée, dans un cadre cohérent et plus large.

INTRODUCTION

I. La mitose.

La division qui conduit à la formation de deux cellules filles au patrimoine génétique identique à la cellule mère, la mitose, est un élément fondamental du développement embryonnaire. Ce processus permet la formation d'organismes composés de quelques 100 000 milliards de cellules chez l'homme, à partir d'une cellule unique appelée cellule œuf. La fidélité de chaque mitose nécessite une coordination spatiale et temporelle entre la ségrégation des chromosomes et le clivage de la cellule mère, pour que l'information génétique soit correctement transmise aux cellules filles.

Après la naissance, la multiplication des cellules continue au cours de la croissance. Chez l'adulte, les mitoses sont nécessaires pour remplacer les cellules vieillissantes et ainsi assurer les fonctions des divers tissus et organes. La fréquence des mitoses est propre au type cellulaire, avec des durées de vie de 3 à 5 jours pour une cellule intestinale, 120 jours pour une hématie et plusieurs dizaines d'années pour la plupart de nos neurones. L'équilibre dynamique, ou homéostasie, entre prolifération, différenciation et mort cellulaire est indispensable à la vie des organismes. Une rupture de cette homéostasie, due par exemple à une altération des communications intercellulaires, peut conduire à une prolifération cellulaire anarchique à l'origine des cancers. A l'inverse, un ralentissement du remplacement des cellules peut causer des maladies dégénératives. Si l'on comprend bien la portée du contrôle du nombre des mitoses, il faut aussi introduire l'importance du contrôle du changement de la forme des cellules en mitose.

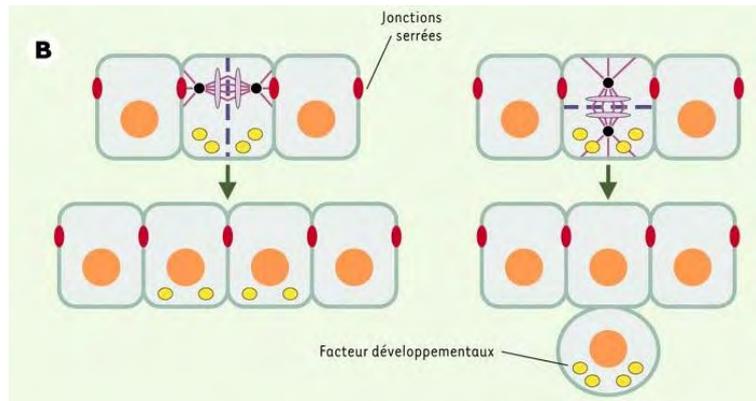
Un exemple frappant est la conséquence de la « géométrie » de la mitose au sein d'un tissu épithélial (*figure 1*). Si l'axe de la division s'effectue dans le plan de l'épithélium, les deux cellules filles présenteront des interactions similaires avec leurs voisines, et similaires à celles de la cellule mère. Au contraire, quand la division s'effectue selon l'axe apico-basal (ie, perpendiculaire au plan de l'épithélium) elle peut conduire à deux cellules établissant des interactions très différentes, dont une seule cellule fille restera dans l'épithélium.

L'orientation du plan de clivage peut être donc corrélée à la différenciation cellulaire, au destin des cellules souches, etc... Il existe ainsi de nombreux cas de mitose dite asymétrique, générant deux cellules filles au devenir différent en lien avec la signalisation cellulaire, par exemple la voie Notch. Les mécanismes intimes contrôlant la position du plan de clivage restent cependant à élucider. De nombreuses études montrent que la position du fuseau mitotique pourrait jouer un rôle prépondérant dans ce processus (*figure 1*).

Figure 1 : influence du plan de clivage sur l'organisation des cellules épithéliales.

L'orientation du plan de clivage, préfiguré par la position du fuseau mitotique (en violet) peut conduire à conserver (à gauche) ou modifier (à droite) les interactions cellulaires des produits de la mitose. L'axe de clivage est représenté par une ligne discontinue bleu foncé.

D'après Gönczy, 2003.



Comment le fuseau s'oriente au cours de la division asymétrique est relativement bien connu, de part l'identification et la caractérisation fonctionnelle de nombreux acteurs moléculaires impliqués dans la mise sous tension des microtubules notamment, incluant le complexe Dynéine-Dynactine, les protéines PAR, NuMa ou encore LGN pour ne citer que quelques exemples [4]. Il est cependant probable que certains éléments ou partenaires du fuseau mitotique détectent des modifications locales des propriétés du cortex, concourant à générer les coordonnées de la division. En retour, la position du fuseau influence l'organisation locale du cortex, pour la mise en place du sillon de clivage.

D'une manière générale, on connaît mal l'organisation du cortex en mitose, la nature des facteurs impliqués, leurs rôles et leurs régulations. Un aspect essentiel qui doit être souligné est la dynamique de la réorganisation de la forme cellulaire en mitose. Il est tentant d'imputer, au moins en partie, la pauvreté de notre compréhension actuelle du cortex mitotique à des approches basées sur une observation statique (cellules fixées) et souvent corrélative. Le pari central de ce travail est que, malgré sa lourdeur évidente, une approche fonctionnelle de la dynamique du cortex pourrait permettre de mieux comprendre la réorganisation de la forme, la « morphogenèse » des cellules au cours de la mitose.

Dans cette première partie, nous voulons tout d'abord rappeler les caractéristiques majeures de la division cellulaire, ou comment repérer les grandes étapes de ce processus dynamique.

11. La prophase.

La prophase est caractérisée par une réorganisation de la chromatine qui se condense en chromosomes compacts facilement visibles en microscopie photonique (*figure 2A*). Chaque chromosome est constitué de deux chromatides sœurs réunies au niveau du centromère (*figure 2B*), la cohésion entre les chromatides sœurs étant indispensable au partage équitable du génome qui aura lieu plus tardivement en anaphase A.

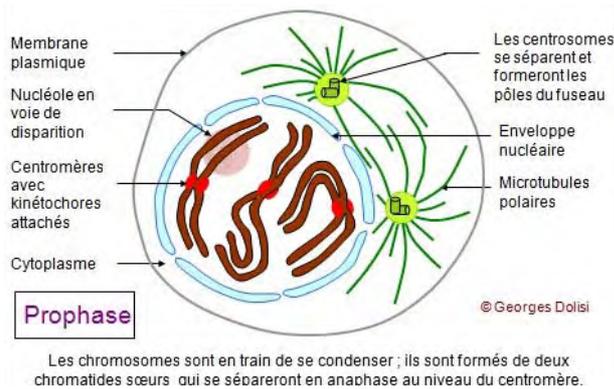


Figure 2B :
structure d'un chromosome.
D'après G.Dolisi, La mitose, chapitre 3, 2009

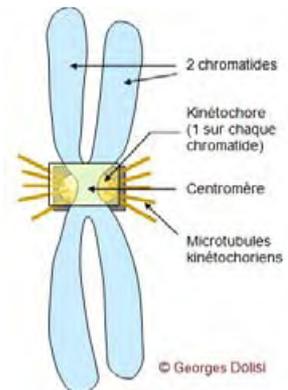


Figure 2A : représentation schématique d'une cellule en prophase. *D'après G.Dolisi, La mitose, chapitre 3 2009*

Une autre caractéristique de la prophase correspond à la maturation des centrosomes. Riches en Tubuline γ , ils constituent des centres organisateurs de microtubules (MTOC), qui s'écartent et migrent progressivement de façon diamétralement opposée [5] (*figure 2A*). Cette migration des centrosomes préfigure la localisation du fuseau mitotique. Les filaments d'Actine se réorganisent et se répartissent de façon homogène au cortex cellulaire, ce qui concourt à l'arrondissement qui caractérise les cellules à l'entrée en mitose.

12. La prométaphase.

La rupture de l'enveloppe nucléaire, qui se dissocie en de nombreuses vésicules (*figure 3*), marque le début de la prométaphase. Cette modification de l'organisation membranaire interne, incluant aussi le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, facilite la réorganisation des microtubules en éliminant les barrières physiques que pourraient constituer ces organites dans le cytoplasme. A partir des deux centrosomes vont rayonner plusieurs types de microtubules : (i) les microtubules astraux, qui s'orientent des centrosomes en direction du cortex et qui participent au positionnement du fuseau mitotique, (ii) les microtubules polaires qui vont relier les deux centrosomes entre eux, et (iii) les microtubules kinétochoriens qui s'attachent aux kinétochores des chromosomes, une

structure protéique associée à l'ADN centromérique (*figure 3 et figure 2B*). Suite à des polymérisations / dépolymérisations successives, les microtubules kinétochoriens vont exercer des tensions sur les chromosomes, qui vont participer à leur migration dans le cytoplasme.

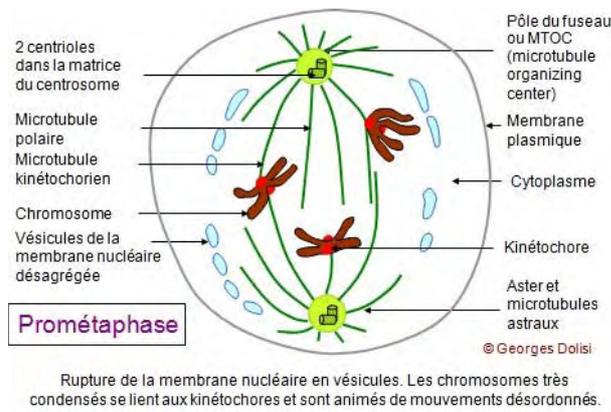


Figure 3 : représentation schématique d'une cellule en prométaphase.

D'après G.Dolisi, La mitose, chapitre 3, 2009

13. La métaphase.

En métaphase, le fuseau mitotique est constitué de deux réseaux symétriques et antiparallèles de microtubules, qualifiés de kinétochoriens ou d'astraux (*figure 4*). De par l'équilibre des tensions exercées par les microtubules kinétochoriens provenant de chaque centrosome, les chromosomes vont s'aligner sur le plan équatorial pour constituer la plaque métaphasique (*figure 4*). Cette relocalisation des chromosomes s'effectue grâce au remaniement dynamique des microtubules. La transition entre la métaphase et l'anaphase se fait suite à l'alignement du dernier chromosome sur la plaque métaphasique, lorsque la cohésion entre les chromatides sœurs est rompue permettant la ségrégation des deux lots de chromosomes.

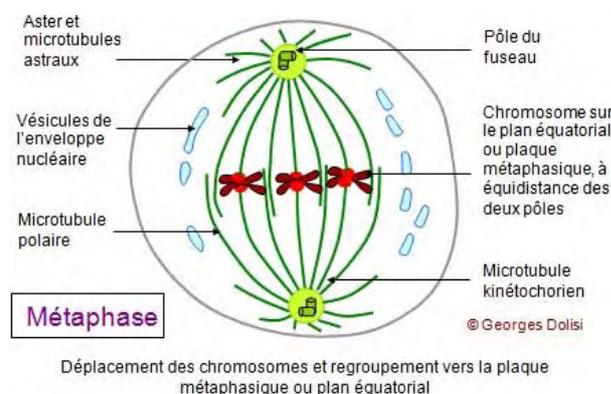


Figure 4 : représentation schématique d'une cellule en métaphase.

D'après G.Dolisi, La mitose, chapitre 3, 2009

14. L'anaphase.

L'anaphase peut être scindée en deux étapes, appelées anaphase A et anaphase B. L'anaphase A est caractérisée par la ségrégation des deux chromatides sœurs de chaque chromosome. Elles vont migrer en sens inverse, en direction des pôles cellulaires grâce entre autres à un raccourcissement des microtubules kinétochoriens. Entre les deux lots de chromosomes, des microtubules polaires et des microtubules néoformés vont s'associer pour former le fuseau central, important pour localiser le sillon de clivage dans certains types cellulaires comme nous le verrons par la suite (cf. 3311. Modèle de contraction équatoriale chez les mammifères). L'anaphase B est caractérisée par un allongement du fuseau mitotique, induit par au moins deux types de forces. D'une part des forces « répulsives » au centre du fuseau qui tendent à éloigner les microtubules polaires provenant de chacun des deux pôles, et d'autre part des forces externes au fuseau exerçant une tension sur les microtubules astraux. L'anaphase B est également caractérisée par une élongation de la cellule (*figure 5*), qui va par la suite se contracter à l'équateur grâce à la formation et la contraction d'un anneau d'Actomyosine (*figure 6*).

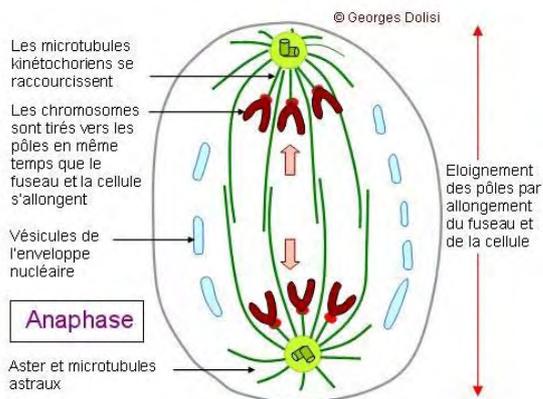


Figure 5 : représentation schématique d'une cellule en début d'anaphase B.

D'après G.Dolisi, La mitose, chapitre 3, 2009

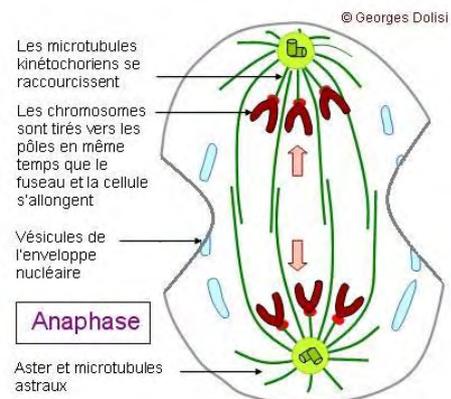


Figure 6 : représentation schématique d'une cellule en fin d'anaphase B.

D'après G.Dolisi, La mitose, chapitre 3, 2009

La transition entre l'anaphase B et la télophase est difficile à définir de manière absolue. Dans l'équipe, les cellules sont considérées comme étant encore en anaphase B lorsque les chromatides sœurs regroupées aux deux pôles de la cellule présentent l'aspect d'une comète et que l'ingression du sillon de clivage n'est pas complète. Lorsque le marquage de l'ADN donne une forme sphérique et que les microtubules du fuseau central semblent associés, nous considérons que les cellules sont en télophase.

15. La télophase.

En télophase, les chromatides regroupées à chacun des deux pôles de la cellule se décondensent et les vésicules de l'enveloppe nucléaire se regroupent pour délimiter les deux nouveaux noyaux (*figure 7*). Les microtubules astraux se dépolymérisent, et les microtubules polaires du fuseau central se condensent pour former le corps intermédiaire, ou « midbody », à l'intérieur du pont intercellulaire qui relie les deux cellules filles. Cette structure, décrite pour la première fois par Flemming en 1891, contient des protéines indispensables à la cytokinèse, c'est-à-dire au clivage de la cellule mère en deux cellules filles [6, 7]. En fin de télophase, l'invagination de la membrane plasmique à l'équateur de la cellule induite par la contraction de l'anneau d'Actomyosine est totale, et le clivage proprement dit, l'abscission, s'opère.

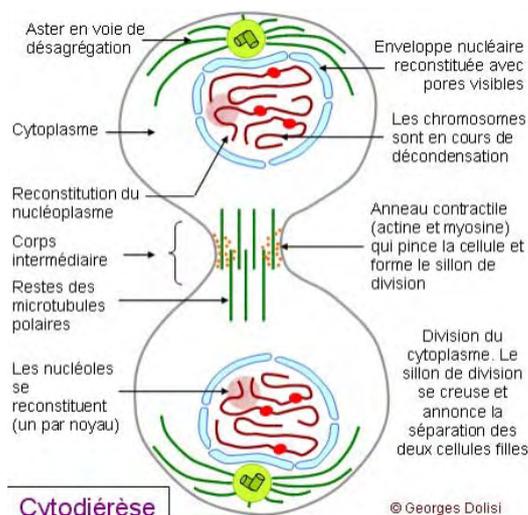


Figure 7 : représentation schématique d'une cellule en fin d'anaphase B.

D'après G.Dolisi, La mitose, chapitre 3, 2009

16. La mitose : une chorégraphie dynamique.

Si ce découpage de la mitose en différentes phases est intellectuellement nécessaire à sa description, il tend à sous-représenter l'importance de la coordination, spatiale et temporelle, de la réorganisation des différents éléments de la cellule. Le clivage de la cellule mère doit être coordonné à la ségrégation des chromosomes, afin d'assurer la transmission fidèle de l'information génétique. L'organisation dynamique des microtubules dans le temps et dans l'espace est primordiale pour la genèse de la structure éphémère qu'est le fuseau mitotique. Loin d'être figé, le remodelage de cette structure à chaque étape de la mitose est essentiel au bon déroulement de la division cellulaire [8]. Le cytosquelette d'Actine est aussi sujet à un remodelage dynamique, et est indispensable à l'arrondissement des cellules à l'entrée en division puis à la contraction du sillon de clivage. La réorganisation des microtubules et des microfilaments d'Actine est au moins en partie liée à leur capacité

spécifique de polymérisation et de dépolymérisation, dont nous allons rappeler brièvement les caractéristiques et leurs régulateurs principaux.

II. Deux composantes du cytosquelette au cœur de la mitose, l'Actine filamenteuse et les microtubules.

21. Dynamique de l'Actine et régulateurs principaux.

Les filaments d'Actine, associés à la Myosine, jouent un rôle déterminant dans les modifications de forme successives des cellules en division, depuis l'entrée en mitose jusqu'à la cytodérèse. La formation des filaments d'Actine et leur interaction avec la Myosine ont fait l'objet de nombreuses études, de la biophysique *in vitro* à la biologie cellulaire *ex et in vivo*.

211. La dynamique de polymérisation de l'Actine *in vitro*.

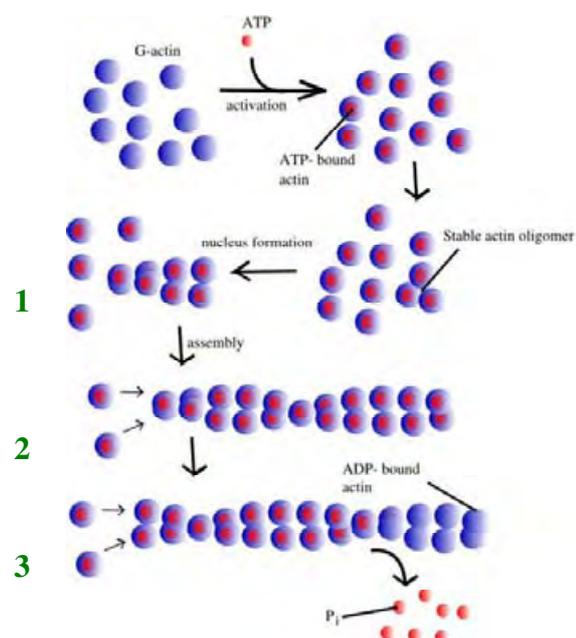
La polymérisation de l'Actine *in vitro* peut être décomposée en trois étapes (figure 8). La première, la nucléation, est cinétiquement limitante et correspond à l'auto-assemblage de trois monomères d'Actine globulaire (Actine-G) qui vont former un oligomère thermodynamiquement stable. Si la concentration en Actine-G est supérieure au seuil critique d'assemblage, la polymérisation en filaments se produit, c'est l'étape dite d'élongation. Au cours de cette deuxième étape, des monomères d'Actine liés à de l'ATP s'associent aux filaments d'Actine, les cinétiques d'assemblage et de dissociation étant différentes aux extrémités « + » et « - ».

Figure 8 : dynamique de polymérisation de l'Actine *in vitro*.

La polymérisation d'Actine globulaire (sphères bleues) liée à l'ATP (sphères bleues et rouges) va permettre la formation de filaments d'Actine. Ce processus peut être scindé en trois étapes :

- 1- nucléation de l'Actine,
- 2- élongation des filaments d'Actine,
- 3- phase d'équilibre.

UC National Library of Medicine



L'extrémité « + », ou « barbue », présente une polymérisation rapide de l'Actine, alors que la polymérisation de l'Actine est beaucoup plus lente à l'extrémité « - », ou « pointue ». Par ailleurs, l'ATP lié aux monomères d'Actine incorporés dans le filament est rapidement hydrolysé, favorisant sa dépolymérisation. L'extrémité barbue est principalement composée d'Actine associée à de l'ATP et l'extrémité pointue d'Actine associée à de l'ADP, d'où une dépolymérisation plus rapide à l'extrémité pointue. La troisième phase correspond à un état d'équilibre, pour laquelle la concentration en Actine est proche du seuil critique d'assemblage.

212. Régulation de l'Actine filamenteuse *in vivo*.

In vivo, les filaments d'Actine sont des structures polarisées et très dynamiques. Leur stabilité et leur organisation sont contrôlées, en plus des paramètres intrinsèques, par de nombreuses protéines régulatrices. L'analyse des mécanismes de migration bidimensionnelle, utilisant des cellules en culture, a permis des avancées notables dans notre compréhension de la dynamique des filaments d'Actine. Ainsi, la protéine Profiline facilite l'échange de l'ADP par l'ATP sur les monomères d'Actine. La Profiline se fixe à l'Actine monomérique liée à l'ATP et favorise son intégration dans le polymère (*figure 9*). Les protéines WASp/Scar (Wiskott-Aldrich Syndrome protein/Suppressor of cyclic AMP receptor) activent le complexe protéique ARP2/3 (Actin Related Proteins 2 et 3), qui permet l'initiation de la polymérisation en favorisant la nucléation et/ou le branchement (*figure 9*). La polymérisation des filaments d'Actine est influencée par différentes protéines régulatrices, qui vont promouvoir ou au contraire ralentir l'élongation des filaments. Ainsi, les extrémités « + » des filaments peuvent être protégées par des protéines de coiffe telles que le complexe protéique CapZ, qui bloque la croissance des filaments à leur extrémité barbue (*figure 9*). La Gelsoline, en présence d'une concentration élevée d'ions calcium, se fixe au polymère d'Actine et crée une coupure du filament d'Actine entraînant sa dislocation. La Gelsoline reste ensuite fixée à l'extrémité « + » du filament, évitant ainsi sa repolymérisation rapide. Enfin, l'hydrolyse progressive de l'ATP en ADP permet la fixation de molécules de Cofiline ou d'ADF (Actin Depolymerizing Factor), qui désassemblent les filaments par fragmentations successives puis dépolymérisation (*figure 9*). Les monomères d'Actine liés au GDP peuvent alors de nouveau se complexer à la Profiline qui va permettre l'échange du GDP par du GTP et le cycle recommence (*figure 9*).

Dans un contexte de division cellulaire, la petite GTPase RhoA interagit avec la formine Diaphanous et la régule positivement, permettant la nucléation de filaments d'Actine non branchés [9] [10], [11]. Au delà de la migration, de nombreux régulateurs de l'Actine

sont aussi essentiels au déroulement de la division cellulaire. L'élément le plus flagrant est bien sur la contraction de l'Actomyosine, nécessaire aux modifications morphologiques observées durant la mitose (cf. III).

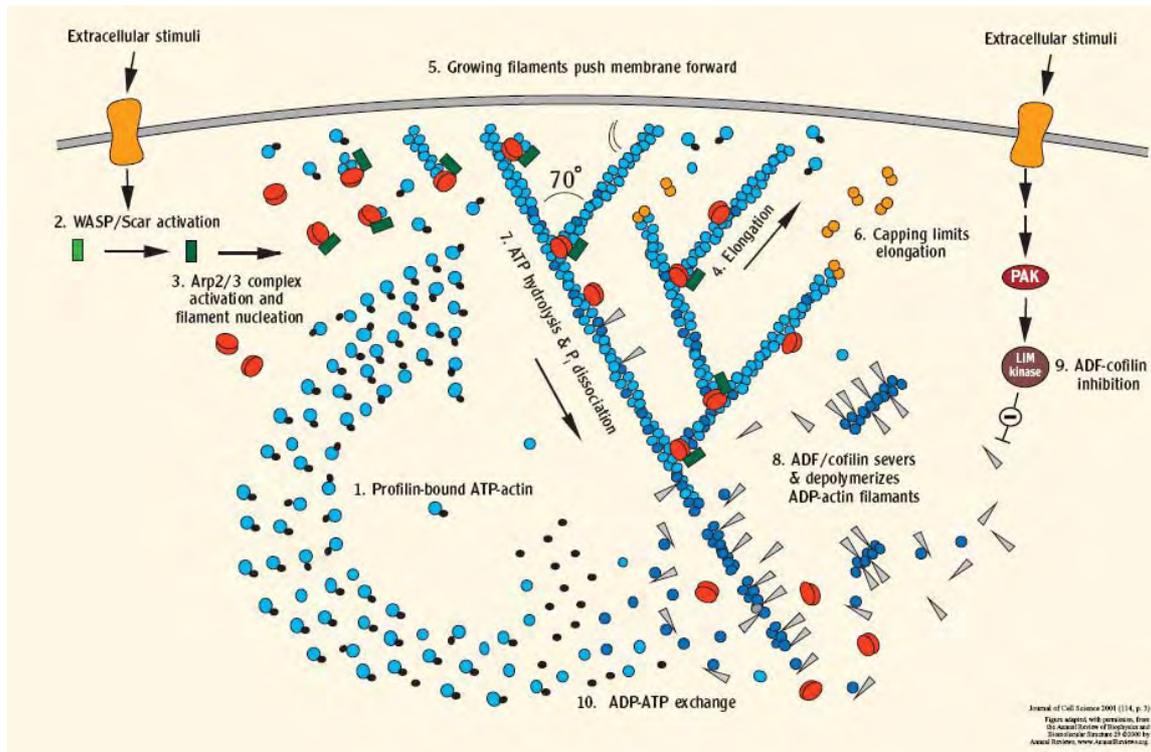


Figure 9 : modèle de régulation des filaments d'Actine au front de migration des cellules dendritiques.

(1) Liaison de la Profiline aux monomères d'Actine liés à l'ATP. (2) Activation des protéines WASp/Scar suite à l'activation de récepteurs par des signaux extracellulaires. (3) Les protéines WASp/Scar se lient au complexe Arp2/3 et permettent la nucléation de l'actine. (4) Croissance rapide des filaments d'actine (5) qui exercent une pression sur la membrane plasmique. (6) Les protéines de coiffe stoppent la polymérisation de l'Actine. (7) Hydrolyse de l'ATP. (8) L'ADF/Cofiline coupe les filaments d'Actine lié à l'ADP et promeut leur dépolymérisation. (9) Inhibition de l'ADF/Cofiline par la LIM kinase. (10) La Profiline catalyse l'échange ADP/ATP des monomères d'actine et le cycle recommence.

D'après Pollard & al, 2000.

213. L'Actomyosine

L'Actomyosine, connue pour ses propriétés contractiles, est composée d'Actine filamenteuse et de Myosine II phosphorylée. Les molécules de Myosine II sont constituées de deux chaînes lourdes (MHC pour Myosin Heavy Chain) et de quatre chaînes légères (MLC pour Myosin Light Chain) (*figure 10*). Chaque chaîne lourde est composée d'une tête globulaire et d'une queue. La tête globulaire contient un domaine catalytique ATPase (et également le site de fixation à l'Actine) et un domaine régulateur.

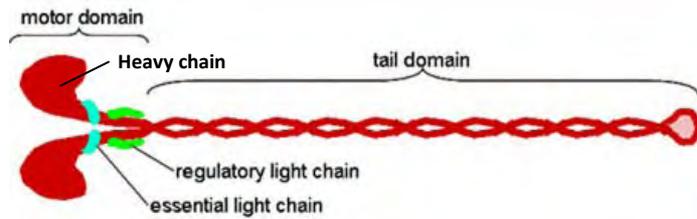


Figure 10 : représentation schématique de la Myosine II. La Myosine II est constituée de deux chaînes lourdes (en rouge), de deux chaînes légères qualifiées d'essentielles (en bleue) et de deux chaînes légères régulatrices (en vert).

Au début du cycle, les têtes des chaînes lourdes de Myosine II se lient à l'Actine filamenteuse (*figure 11*). Cette interaction est de très courte durée car la fixation d'une molécule d'ATP sur la Myosine réduit son affinité pour les filaments d'Actine. L'hydrolyse de l'ATP par le domaine ATPase des chaînes lourdes induit un changement de conformation de la Myosine, déplaçant le domaine régulateur d'un angle de 70° vers l'extrémité barbue du filament d'Actine (*figure 11*). Les têtes se lient de nouveau à l'Actine, puis la perte du phosphate replace les têtes de Myosine II à leur position de départ, déplaçant ainsi les filaments d'Actine (d'environ 10nm). L'ADP se détache, est remplacé par une nouvelle molécule d'ATP et un nouveau cycle peut recommencer. La Myosine peut donc être considérée comme un moteur moléculaire dont l'énergie provient de l'hydrolyse de l'ATP.

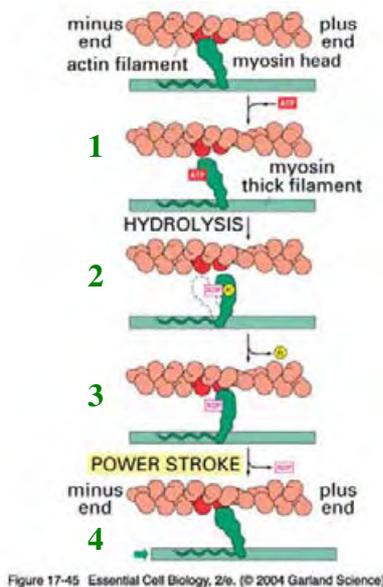


Figure 11 : la modification conformationnelle de la Myosine II permet un déplacement des filaments d'Actine. (1) La liaison de l'ATP à la Myosine II (en vert) entraîne sa dissociation des filaments d'Actine (en rose). (2) L'hydrolyse de l'ATP modifie la conformation de la Myosine II, qui se lie de nouveau aux filaments d'Actine (3). Enfin, (4) la perte de l'ADP modifie la conformation de la Myosine II qui revient à sa position de départ permettant un déplacement des filaments d'Actine. D'après Rament & al, 1993.

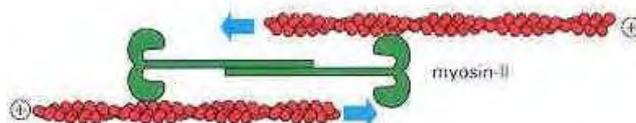


Figure 12 : rôle de la Myosine II dans la contraction de l'Actomyosine. Plusieurs molécules de Myosine II (en vert) peuvent s'associer antiparallèlement, permettant un glissement de plusieurs filaments d'Actine (en rouge) en sens contraire (flèches bleues). D'après Alberts & al, 1994.

La queue des chaînes lourdes permet à plusieurs molécules de Myosine de s'associer entre elles pour former des oligomères (*figure 12*), importants pour exercer des forces entre plusieurs filaments d'Actine, comme c'est le cas lors de la contraction de l'anneau d'Actomyosine en ana/télophase. Pour que la Myosine puisse exercer son rôle moteur, ses chaînes légères doivent être activées par phosphorylation, un mécanisme

dépendant de la petite GTPase Rho [12]. Des études réalisées dans des cellules de mammifères et de drosophile, montrent que la Rho-kinase, un effecteur de Rho, phosphoryle directement la chaîne légère de la Myosine II sur la thréonine 18 et la sérine 19, ou sur la thréonine 20 et la sérine 21 respectivement [13], [14]. La Rho-kinase peut aussi contrecarrer la déphosphorylation des chaînes légères de Myosine, en inactivant par phosphorylation la phosphatase de la Myosine [15]. L'importance de la Rho-kinase dans l'activation par phosphorylation de la MLC a été démontrée *in vivo*, via l'utilisation d'un mutant phosphomimétique de la chaîne légère de la Myosine. L'expression de cette MLC phosphomimétique dans des drosophiles mutantes pour la Rho-kinase sauve la létalité induite par l'absence de la Rho-kinase endogène [16].

22. Dynamique des microtubules et principaux régulateurs.

Lors de la mitose, le fuseau mitotique permet l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique puis la répartition équitable du matériel génétique entre les deux cellules filles. Ce processus microtubules-dépendant est critique, puisqu'une organisation altérée du fuseau mitotique peut conduire à une mauvaise ségrégation des chromosomes, générant ainsi de l'instabilité génétique à l'origine et/ou favorisant la transformation cellulaire. En plus d'assurer la séparation des chromosomes, les microtubules contribuent à localiser l'anneau d'actomyosine (cf. 331). Ces processus sont rendus possible grâce à la dynamique des microtubules, dont l'instabilité dépend de paramètres intrinsèques aux dimères de tubuline et de facteurs additionnels.

221. Régulation du réseau microtubulaire au cours du cycle cellulaire.

Les microtubules sont des polymères de Tubuline, en équilibre dynamique entre polymérisation et dépolymérisation. La transition entre polymérisation et dépolymérisation est appelée « catastrophe », et la transition inverse « sauvetage » (*figure 13*).

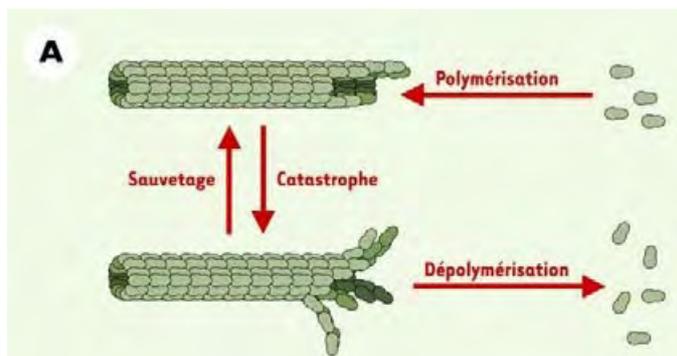


Figure 13 : représentation schématique des évènements de sauvetage et de catastrophe que peuvent subir les microtubules.

Les « sauvetages » correspondent à la polymérisation des microtubules (en vert), alors que les évènements « catastrophes » correspondent à leur dépolymérisation.

D'après Arnal & al, 2002

Les microtubules peuvent également être stabilisés sans se polymériser ni se dépolymériser, on les considère alors en « pause ». Cette succession de catastrophes et de sauvetages permet de moduler l'organisation des microtubules dans la cellule, et joue un rôle clef pour l'organisation et la dynamique du fuseau mitotique. La dynamique des microtubules est régulée au cours du cycle cellulaire, passant d'une demi-vie d'environ quinze minutes en interphase à trente à quatre vingt dix secondes en moyenne en mitose [17], [18]. Cette instabilité accrue des microtubules en mitose provient essentiellement d'une augmentation de cinq à dix fois de la fréquence des catastrophes.

En interphase, les microtubules émanent du centre organisateur de microtubules situé près du noyau et de l'appareil de Golgi, et forment un réseau de microtubules relativement longs et stables (*figure 14A*). A l'entrée en division, les microtubules interphasiques se dépolymérisent en molécules de Tubuline, qui vont se réassocier progressivement pour former le fuseau mitotique [17], [18] (*figure 14B*). Ce fuseau, une structure bipolaire, va évoluer rapidement au cours des étapes successives de la division cellulaire grâce à l'instabilité relative des différents types de microtubules qui le composent : astraux, polaires, kinétochoriens ou du fuseau central.

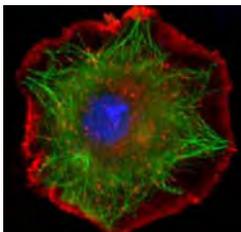


Figure 14A : organisation des microtubules en interphase.

Marquage des microtubules (en vert) d'une cellule de drosophile S2 en interphase. Le réseau microtubulaire est formé de microtubules relativement longs qui remplissent tout l'espace intracellulaire. L'Actine est marquée en rouge par la phalloïdine Texas-RedX et l'ADN en bleu par le DAPI.

Photo déconvoluée de Sébastien Carréno.

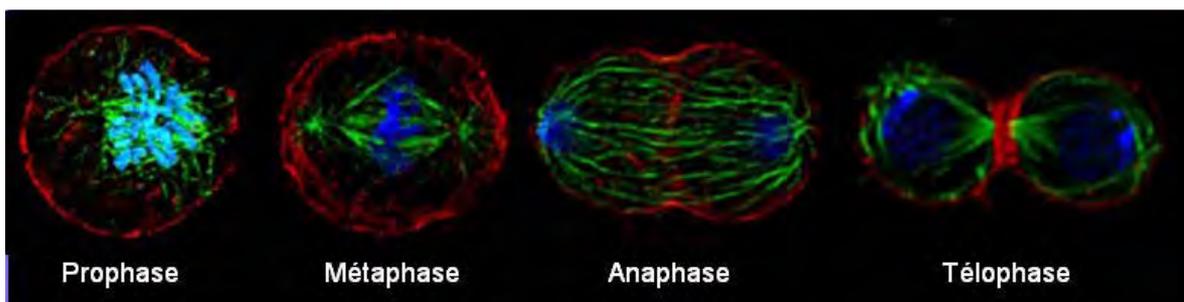


Figure 14B : organisation des microtubules en mitose.

Marquage des microtubules (en vert) de cellules de drosophile S2 en mitose incluant une prophase, une métaphase, une anaphase et une téléphase. Les microtubules sont organisés de façon à former le fuseau mitotique. L'Actine est marquée en rouge par la phalloïdine Texas-RedX et l'ADN en bleu par le DAPI. *D'après Carréno & al, 2008.*

222. Structure et constituants des microtubules.

Les microtubules sont des polymères dont l'unité de base est un dimère de Tubuline α et β (*figure 15*). Ces hétérodimères s'associent en treize protofilaments qui s'assemblent

latéralement entre eux formant ainsi des feuillets, ces derniers se repliant progressivement sur eux-mêmes pour former les microtubules [19] (*figure 15*).

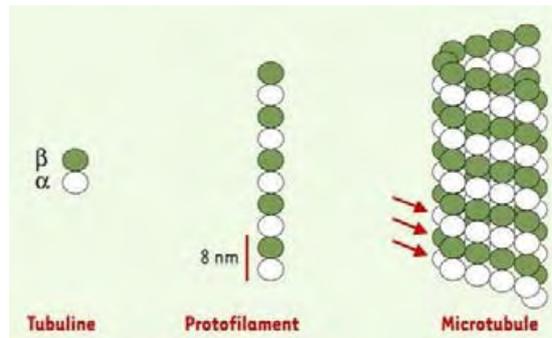


Figure 15 : structure d'un microtubule.

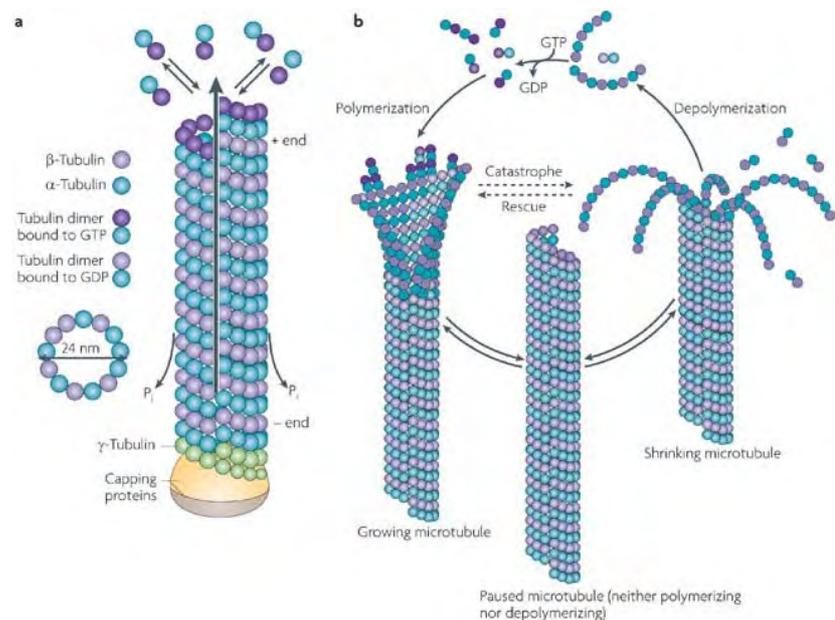
Les microtubules sont formés de treize protofilaments eux-mêmes constitués d'une association d'hétérodimères d' α - (sphères blanches) et de β -Tubuline (sphères vertes).
D'après Arnal & al, 2002

Les microtubules sont polaires, avec une extrémité « - » ancrée au niveau des MTOC, et une extrémité « + », à croissance et décroissance rapide (succession de catastrophes et de sauvetages). L'hydrolyse du GTP est à la base de cette instabilité. Quand un dimère de Tubuline s'ajoute à l'extrémité « + » d'un microtubule, la β -Tubuline est associée à une molécule de GTP (*figure 16*).

Figure 16 : instabilité dynamique des microtubules.

Les microtubules sont polarisés, l'incorporation de dimères d' α - et de β -Tubuline liés au GTP étant favorisée à leur extrémité « + ». Les microtubules cyclent perpétuellement entre polymérisation et dépolymérisation, d'où le terme d'instabilité dynamique.

D'après Conde & al, 2009.



Nature Reviews | Neuroscience

L'hydrolyse du GTP change la conformation de la Tubuline en induisant une courbure [20] visible en cryomicroscopie électronique [21] (*figure 17*), favorisant la séparation des protofilaments à leur extrémité « + », ainsi que leur dépolymérisation (*figure 16*). La β -Tubuline est liée au GDP sur la majeure partie de la paroi des microtubules, alors qu'à l'extrémité « + » la β -Tubuline est liée au GTP et forme une coiffe permettant la polymérisation par ajouts de nouveaux hétérodimères de Tubuline. La perte de cette coiffe entraînerait les catastrophes [22] (*figure 16*). Une étude récente montre également que ces

îlots de Tubuline-GTP sont également présents à l'intérieur des microtubules et permettent la repolymérisation rapide observée lors des sauvetages. Un autre modèle démontre que les modifications conformationnelles du dimère de Tubuline α et β ne sont pas induites par la fixation d'une molécule de GTP, mais par l'incorporation de ce dimère dans le feuillet de Tubuline [23]. Dans ce modèle, le GTP jouerait un rôle secondaire en modulant les interactions entre les protofilaments du feuillet [23].

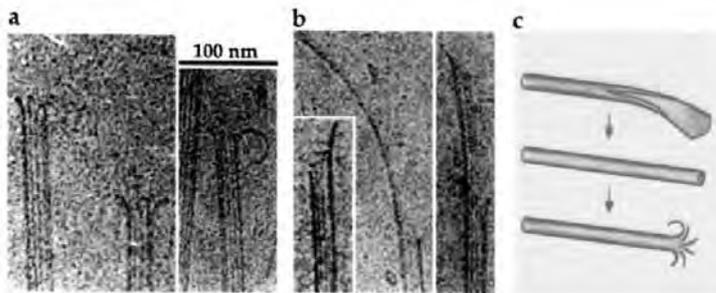


Figure 17 : Structure des microtubules obtenue par cryo-microscopie électronique. (a) microtubules en cours de dépolymérisation, (b) microtubules en cours de polymérisation, (c) dessins illustrant successivement les événements de sauvetage et de catastrophe. D'après Chretien & al, 1995 (a et b) et Desai & al, 1997 (c).

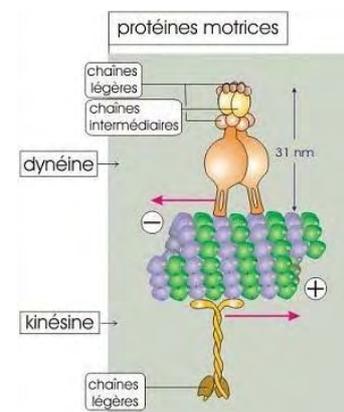
223. Protéines MAP, facteurs de catastrophe et protéines motrices.

Il existe des facteurs protéiques qui régulent la dynamique des microtubules [19]. Ainsi, les Microtubules Associés Protéiques (MAPs) se lient et modulent les propriétés des microtubules, en les stabilisant et/ou en stimulant leur vitesse de polymérisation [24]. Par exemple, pour une même concentration de Tubuline, on estime que le taux de polymérisation de la Tubuline est cinq à dix fois plus important *in vivo* qu'*in vitro*. Les facteurs de catastrophe déstabilisent les microtubules, favorisant la réduction rapide de leur taille. D'autres protéines, motrices, se déplacent sur ces polymères de Tubuline en utilisant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP [25]. Ces protéines forment deux familles : les Kinésines, qui se déplacent vers l'extrémité « + » des microtubules [26] (exception faite pour les Kinésines de la sous-famille Kinésine-14 qui se déplacent vers l'extrémité négative des microtubules), et les Dynéines, qui se déplacent vers l'extrémité « - » [27] (*figure 18*).

Figure 18 : les Dynéines et les Kinésines sont des protéines motrices associées aux microtubules.

Parmi les MAPs (Microtubules Associated Proteins) se trouvent les Dynéines, qui se déplacent vers l'extrémité « - » des microtubules, et les Kinésines qui elles se déplacent vers leur extrémité « + ».

D'après Kramer et Tramu, 2009



En plus de permettre un transport orienté le long des microtubules, les Dynéines sont impliquées dans la formation du fuseau mitotique en permettant la séparation des centrosomes et la convergence des microtubules aux pôles du fuseau [28], [29], [30], [31], [32], [33], [34]. [35], [36]. Les Kinésines participent aussi à la séparation des centrosomes et à la formation des pôles du fuseau mitotique, en favorisant la convergence des microtubules du fuseau à leur extrémité négative [37], [34], [38].

23. Quand l'Actine et les microtubules communiquent.

Plusieurs protéines sont connues pour lier à la fois l'Actine et les microtubules, parmi lesquelles se trouvent les Spectraplakines ou encore le complexe Dynéine/Dynactine [39], [40]. Le complexe Dynéine/Dynactine se localise non seulement le long des microtubules dans des cellules épithéliales mitotiques, mais également sur des agrégats d'Actine corticaux sur lesquels convergent des microtubules astraux, suggérant que ce complexe puisse participer au « dialogue » Actine/microtubules [40]. Cette communication entre cytosquelette d'Actine et microtubules peut aussi être indirecte, à travers l'activité des régulateurs de l'Actine ou des microtubules. Par exemple, la GTPase Rho régulant l'organisation du cytosquelette d'Actine peut être activée par Rho-GEF-H1, qui elle-même se lie aux microtubules [40]. Un mutant de Rho-GEF-H1 incapable de lier les microtubules induit des modifications de l'organisation de l'actine, induite par une suractivation de Rho au cortex [40]. Les mécanismes permettant un dialogue Actine-microtubules restent cependant mal compris, et donc un champ d'investigation à explorer.

III. Morphogénèse cellulaire des cellules en mitose.

La division cellulaire est caractérisée par une succession de modifications morphologiques. Dès l'entrée en division, en prophase, les cellules adoptent une forme sphérique (*figure 19A*) qui sera maintenue lors des étapes ultérieures jusqu'à l'anaphase A. En anaphase B, les cellules subissent dans un premier temps une déformation conduisant à l'acquisition d'une forme sphéroïde (*figure 19B*), imputée à l'élongation de la cellule. Dans un second temps, une contraction à l'équateur de la cellule associée à une relaxation des pôles lui donne une forme de « cacahuète » (*figure 19C*). Enfin, l'abscission permet de séparer les deux cellules filles, qui vont redevenir sphériques dans le cas des cellules non adhérentes, ou de forme irrégulière dans le cas des cellules adhérentes.

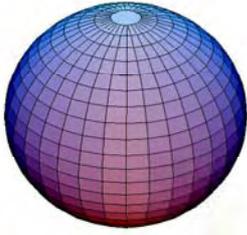


Figure 19A :
représentation
schématique d'une sphère.

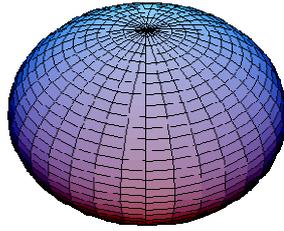


Figure 19B :
représentation
schématique d'un
sphéroïde oblate.

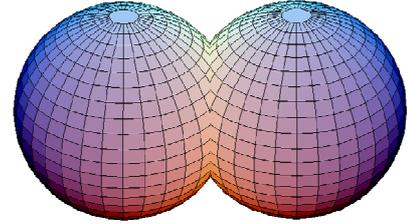


Figure 19C : représentation
schématique d'un objet aux
courbes convexes aux « pôles »
et convexes à « l'équateur ».

La morphogénèse des cellules mitotiques requiert donc successivement 3 étapes : (i) l'arrondissement caractéristique des cellules en prophase, prométaphase, métaphase et anaphase A, (ii) l'élongation cellulaire propre à l'anaphase B, et enfin (iii) le remodelage concave du cortex équatorial en anaphase B dû à l'ingression du sillon.

De nombreuses équipes s'intéressent aux mécanismes contrôlant la forme des cellules mitotiques. Cet effort collectif a généré de nombreuses données sur ce mécanisme, dont les détails varient légèrement en fonction du type cellulaire. Nous nous limiterons aux acteurs majeurs, généralement conservés, ne reflétant probablement pas la diversité et la complexité des mécanismes mis en œuvre. Ceci est particulièrement vrai pour l'étape d'ingression du sillon de clivage (cf. 33).

31. L'arrondissement cellulaire à la transition interphase-mitose.

311. Une caractéristique générale des cellules animales ?

Très tôt au cours du développement, l'entrée en mitose est associée à un arrondissement cellulaire notamment chez les batraciens [41]. Cette modification de la morphologie cellulaire caractérise la majorité des cellules en division aussi bien *in vivo* qu'*ex vivo* [42], [43], [44]. Cet arrondissement du cortex corrèle avec une augmentation de la rigidité corticale mesurée à la transition interphase - mitose. Par exemple, la résistance des œufs d'oursin aux forces de succions exercées à l'aide de micropipettes augmente à l'entrée en division [45]. De même, la microscopie à force atomique a montré que le cortex des cellules de mammifères Ptk2 ou des cellules de drosophile est plus rigide en début de division qu'en interphase [46], [47]. Cette « universalité » suggère que l'arrondissement des cellules associé à l'augmentation de la rigidité corticale à l'entrée en prophase est nécessaire ou contribue au déroulement de la mitose.

312. L'importance de l'arrondissement pour la division cellulaire.

L'entrée en division des cellules adhérentes ou semi-adhérentes s'accompagne d'un mécanisme de dé-adhésion, permettant l'arrondissement cellulaire et l'intégrité de la division. En effet, une adhésion excessive des fibroblastes induite par un traitement du substrat à la fibronectine, se traduit par une morphologie anormale des cellules mitotiques et un fort pourcentage de cellules binucléées. Cette dé-adhésion cellulaire est caractérisée par une dissociation ou une relocalisation cytoplasmique des complexes protéiques nécessaires à l'adhésion. Ainsi, les protéines des points focaux d'adhésion, telles que l'Alpha-Actinine, la Taline ou encore la Focal Adhesion Kinase deviennent cytoplasmiques à l'entrée en division [48], [49], [50]. Il est cependant important de noter que cette dé-adhésion est partielle. A l'entrée en division, les cellules adhérentes (HeLa) restent en partie attachées au substrat par des fibres de rétraction [51], [52], [53], [54], [55] (*figure 20A*).

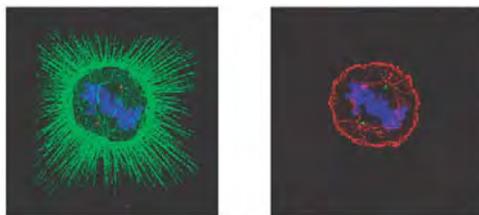


Figure 20A : en mitose les cellules s'arrondissent et présentent des fibres de rétraction.

Cellule HeLa en métaphase, ensemencée sur un patron de fibronectine. L'Actine est en vert, les pôles du fuseau en rouge (panel de gauche) ou en vert (panel de droite), les microtubules astraux en rouge (panel de droite) et l'ADN en bleu.

D'après Théry & al, 2007.

Or ces fibres de rétraction sont importantes pour l'orientation du fuseau mitotique [51], [52], [54], [55]. Des micro-profils de fibronectine permettent de créer des zones de forte adhérence pour les cellules mitotiques, restreignant la formation et/ou la stabilisation des fibres de rétraction dans les zones corticales correspondantes. En fonction de la localisation des fibres de rétraction, on observe une orientation spécifique du fuseau mitotique. Un modèle permet ainsi de prédire l'orientation du fuseau en fonction des zones corticales adhérentes au substrat (*figure 20B*).

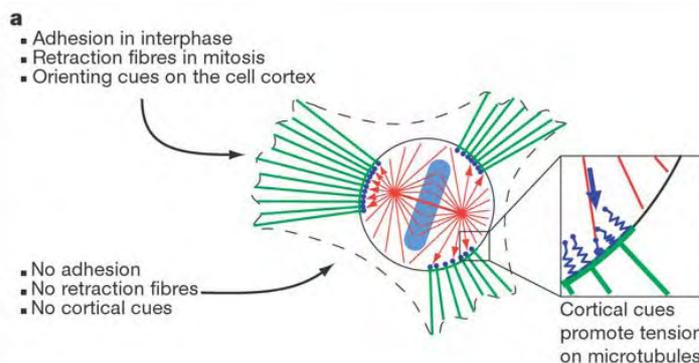


Figure 20B : modèle de l'orientation du fuseau mitotique par les fibres de rétraction.

Représentation schématique d'une cellule mitotique liée au substrat par des fibres de rétraction (en vert). L'enrichissement de ces fibres de rétraction permettrait d'activer localement des protéines corticales capables d'exercer une tension (symbolisée en bleu) sur les microtubules astraux (en rouge) et ainsi d'orienter le fuseau mitotique en fonction des zones adhérentes.

D'après Théry & al, 2007.

Ce modèle est basé sur l'activation de protéines au cortex cellulaire, incluant des protéines motrices et de la famille des ERMs, préférentiellement aux points d'adhérence de la cellule avec le substrat (c'est à dire là où se trouvent les fibres de rétraction). En exerçant une tension sur les microtubules astraux, elles participeraient à l'orientation du fuseau mitotique (*figure 20B*).

L'orientation du fuseau mitotique pourrait également être dépendante d'une interaction entre les microtubules astraux et des structures sub-corticales riches en Actine filamenteuse [55]. La distribution de ces agrégats d'Actine cytoplasmiques, localisés à proximité du cortex, semble être déterminée par les fibres de rétraction [55]. L'orientation du fuseau mitotique pourrait ainsi être contrôlée par une réorganisation du réseau d'Actine cortical mais également sub-cortical. Ces expériences *ex vivo* pourraient contribuer à mieux comprendre le contrôle du plan de clivage tel qu'observé *in vivo*.

313. L'arrondissement cellulaire : un processus complexe et régulé.

Bien que globalement mal compris, les mécanismes qui contribuent aux modifications de forme cellulaire et à l'augmentation de la rigidité corticale à l'entrée en mitose impliquent une réorganisation du cytosquelette d'Actine, contrôlée par des mécanismes Rho-dépendants et/ou Rho-indépendants.

3131. La réorganisation du cytosquelette d'Actine.

Dès 1997, des études menées par Cramer et Mitchison démontrent que la réorganisation du cytosquelette d'Actine à la transition G2/M permet une modification de ses propriétés mécaniques [44]. En interphase, l'Actine filamenteuse est organisée en structures diverses ayant des propriétés mécaniques différentes. Les filaments d'Actine peuvent former des fibres de stress, rigides et contractiles [56], ou des réseaux plus souples tels qu'au sein des lamellipodes. Quand les cellules entrent en mitose, ces différentes structures d'Actine sont réorganisées et les microfilaments d'Actine se relocalisent majoritairement à la périphérie cellulaire [54]. Cette réorganisation de l'Actine au cortex cellulaire s'accompagne d'interactions avec la Myosine, permettant la formation d'un réseau d'Actomyosine sur l'ensemble du cortex (cf. 213). Le caractère globalement isotrope des contractions de ce réseau conduit à l'acquisition d'une forme sphérique par la cellule, associée à une augmentation de la rigidité corticale. Plusieurs voies de signalisation, Rho-dépendantes et/ou Rho-indépendantes peuvent être impliquées dans cette réorganisation du cytosquelette d'Actine.

3132. Réorganisation de l'Actine Rho-dépendante.

Grâce à des approches biochimiques combinées à de la micro-manipulation, Amy Maddox a mis en évidence que Rho A participe au remodelage cortical à l'entrée en mitose [57]. La GTPase Rho, active quand liée au GTP et inactive quand elle est liée au GDP, est régulée par deux types de facteurs : les GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors), et les GAPs (GTPase Activating Proteins) (figure 21).

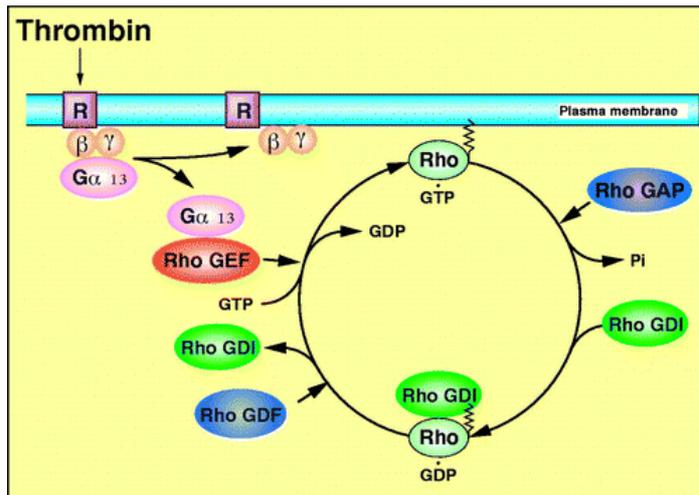


Figure 21 : cycle d'activation des GTPases de la famille Rho.

Les Rho-GTPases oscillent entre un état inactif lorsque liées au GDP, et un état actif quand liées au GTP. Leur cycle d'activation est finement régulé par des régulateurs positifs : les Rho-GEF qui catalysent l'échange GDP/GTP, et des régulateurs négatifs : les Rho-GAP qui favorisent le retour des GTPases à l'état inactif. Enfin, les Rho-GDI séquestrent les Rho-GTPases bloquant ainsi leur activation.

D'après Kaibuchi & al, 1999.

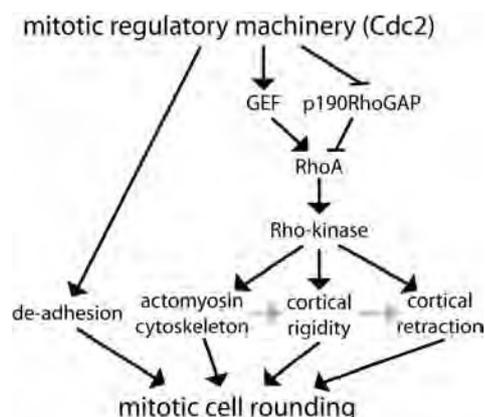
Alors que les GEFs activent la GTPase Rho en substituant une molécule de GTP au GDP, les GAPs inactivent Rho en favorisant l'hydrolyse du GTP [58]. Les GDIs (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors) participent également à l'inactivation des GTPases Rho, en les séquestrant lorsqu'elles sont liées au GDP [58] (figure 21).

En interphase, l'activité de RhoA est globalement faible et celle de son inhibiteur p190RhoGAP élevée. L'entrée en division s'accompagne d'une chute d'activité de p190RhoGAP, associée à une forte activation de RhoA [57]. Cette activation de RhoA à l'entrée en mitose, qui demeure jusqu'en fin de division, a été confirmée dans plusieurs types cellulaires dont les cellules HeLa [57]. Via la kinase Rho-kinase, RhoA stimule la LIM-Kinase qui sous régule la Cofiline, favorisant la fragmentation des filaments d'Actine [59], [60] (cf. 212). La Rho-kinase, qui favorise également la contraction en phosphorylant la chaîne légère de la Myosine II [61], [62] (cf.213), est requise pour l'arrondissement des cellules et l'augmentation de la rigidité corticale à l'entrée en division [57]. En régulant la polymérisation de l'Actine et la phosphorylation de la Myosine, RhoA promeut la formation d'Actomyosine, dont les contractions isotropes vont permettre l'arrondissement cellulaire à la transition interphase - mitose. (figure 22) [57].

Figure 22 : RhoA et la Rho-kinase participent à la réorganisation de l'Actine, à l'augmentation de la rigidité corticale et à la dé-adhésion à l'entrée en mitose.

Les flèches noires symbolisent des stimulations (directes ou indirectes), les lignes suivies d'une barre des inhibitions et les flèches grises des possibles relations causales.

D'après Maddox & al, 2003.



3133. Réorganisation de l'Actine Rho-indépendante.

Bien que l'activation de RhoA et de son effecteur Rho-kinase à l'entrée en division participent à l'arrondissement des cellules à la transition G2/M [57], d'autres travaux soutiennent l'existence d'un ou plusieurs mécanisme(s) Rho-indépendant. Par exemple, l'inhibition de RhoA par la surexpression de p190RhoGAP ou par son ADP-ribosylation (induit par un traitement à la C3) n'altère pas l'arrondissement des cellules Rat1 à l'entrée en division [57]. Par ailleurs, une étude faite au laboratoire [63] et confirmée par une autre équipe [47] met en évidence la contribution des protéines de la famille ERM dans l'acquisition de la forme sphérique à l'entrée en division. En effet, en utilisant des cellules de drosophile S2, l'équipe a montré que l'inhibition de son expression abolit l'arrondissement cellulaire caractéristique des cellules mitotiques [63]. A l'inverse, l'expression d'une forme constitutivement active de la dMoésine suffit à augmenter la rigidité corticale des cellules interphasiques, qui deviennent sphériques [47]. Il semblerait qu'en réorganisant l'orientation des filaments d'Actine ou leur lien à la membrane plasmique, l'activation des protéines ERMs au cortex soit suffisante pour induire l'arrondissement cellulaire et la rigidification corticale.

32. L'élongation cellulaire caractéristique de l'anaphase B précoce : les acteurs moléculaires.

Plusieurs études ont mis en évidence une accumulation de Rho au cortex équatorial lorsque la cellule s'allonge, avant même l'ingression du sillon de clivage [64], [65]. Gilles Hickson *et al* ont confirmé l'implication de Rho dans l'élongation cellulaire et ont identifié plusieurs protéines nécessaires à l'élongation de la cellule en début d'anaphase B [66]. Ainsi, la Rho-kinase est aussi concentrée au cortex équatorial et nécessaire à l'élongation

cellulaire. Comparé aux cellules sauvages en anaphase B (*figure 14B*), l'inhibition de cette kinase conduit à un défaut d'élongation qui se poursuit en télophase (*figure 23A*). De même, la chaîne lourde de la Myosine II Zipper et la chaîne légère de la Myosine II Spaghetti squash sont nécessaires à l'élongation cellulaire [66]. Lors de l'élongation, la phosphorylation de Spaghetti squash au cortex équatorial et la localisation de Zipper à l'équateur sont dépendantes de l'activation de la Rho-kinase, induite par Rho [66] [64], [67]. Une autre étude confirme le rôle essentiel de la Rho-kinase dans la localisation de la Myosine II au cortex équatorial en anaphase. Elle montre de plus que cette localisation corticale est dépendante de la phosphorylation de la chaîne légère de la Myosine et que celle-ci est nécessaire à l'élongation cellulaire (*figure 23B*) [68].

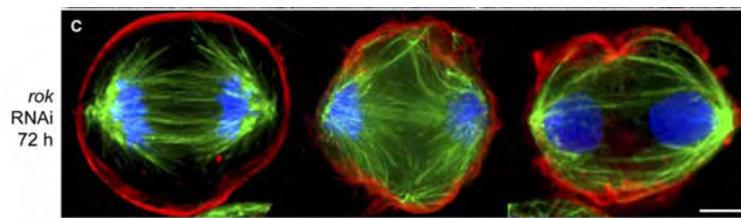


Figure 23A : La Rho-kinase est requise pour l'élongation cellulaire en anaphase.

Cellules S2 traitées par un dsRNA dirigé contre la Rho-kinase, marquées pour les microtubules (vert), l'Actine filamenteuse (rouge) et l'ADN (bleu). Alors qu'en anaphase A la cellule semble normale (gauche), en anaphase B (milieu) et en télophase (droite), les cellules présentent un défaut d'élongation.

D'après Hickson & al, 2006

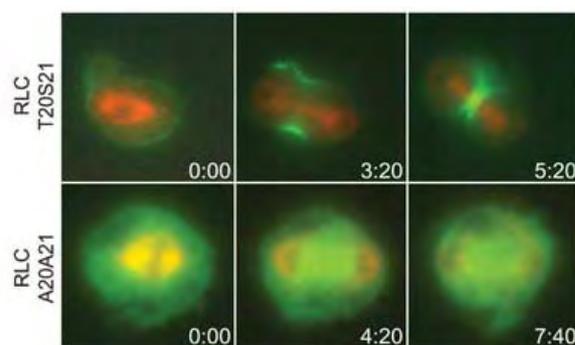


Figure 23B : la phosphorylation de la chaîne légère de la Myosine (RLC) est nécessaire à son recrutement à l'équateur et à l'élongation cellulaire. Cellules S2 traitées par un dsRNA dirigé contre la RLC endogène, et exprimant une forme phosphorylable (RLC T20S21) ou non phosphorylable (RLC A20A21) de la RLC. Le défaut de recrutement de la RLC non phosphorylable au cortex équatorial est associé à un défaut d'élongation cellulaire en anaphase.

D'après Dean & al, 2006.

Puisque l'activation de Rho favorise la formation de l'Actomyosine, on pourrait prédire que l'inhibition de la Rho-kinase se traduise par une relaxation excessive du cortex. De façon surprenante, une étude montre que le défaut d'élongation cellulaire observé suite à l'inhibition de la Rho-kinase est dû au contraire à une rigidité corticale excessive [66]. Ce défaut d'élongation peut être compensé par un traitement des cellules à la latrunculine, qui en séquestrant les monomères d'Actine bloque la polymérisation des filaments d'Actine et induit leur dépolymérisation [69], [66].

D'autre part, l'élongation cellulaire semble au moins en partie induite par l'allongement du fuseau mitotique, qui en exerçant une pression sur le cortex polaire entrainerait une modification de la forme cellulaire [70]. Le défaut d'élongation cellulaire observé suite à l'inhibition de la Rho-kinase n'est pas dû à un défaut d'allongement du fuseau mitotique [66]. En effet, tout semble normal jusqu'à l'anaphase A, puis à l'entrée en anaphase B les pôles des fuseaux mitotiques s'éloignent de manière anormale jusqu'au cortex. Les microtubules polaires continuent de croître, et se déforment en raison de l'incapacité de la cellule à s'allonger [66]. Les mêmes défauts sont observés suite à l'inhibition de Zipper ou de Spaghetti Squash [66].

L'absence des autres constituants de la voie Rho impliqués dans la cytokinèse, tels que Pebble, RacGAP50C ou Diaphanous, n'altèrent que modérément l'élongation cellulaire. Alors que Pebble est essentielle à l'ingression du sillon de clivage, elle n'est pas indispensable à l'élongation cellulaire (qui est réduite de moitié), de même pour RacGAP50C [66]. Enfin, alors que Diaphanous est essentielle à la cytokinèse [9], son inhibition (ou celle de la kinase Citron) n'a pas d'effet sur l'élongation cellulaire [66].

L'élongation cellulaire et l'ingression du sillon de clivage, deux remodelages rapides de la morphologie cellulaire en anaphase B, sont donc contrôlées par des voies de signalisation communes, certains acteurs étant cependant spécifiques à l'élongation ou à l'ingression du sillon (*figure 24*).

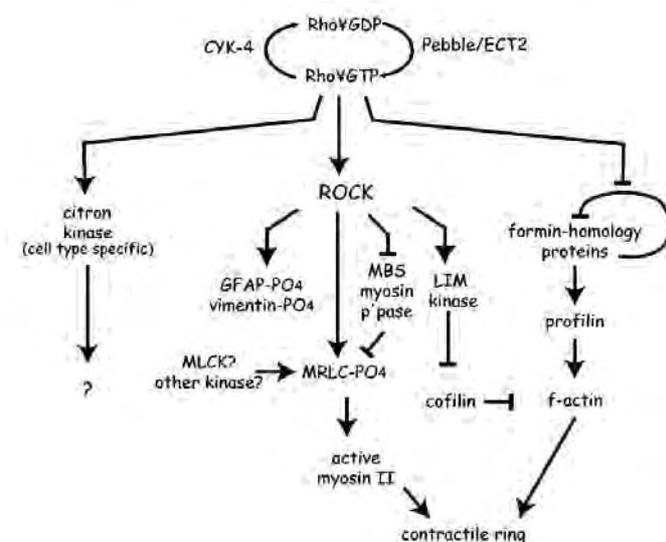


Figure 24 : les voies de signalisation Rho-dépendantes sont impliquées dans l'élongation cellulaire et dans la contraction équatoriale.

Les flèches noires symbolisent des stimulations (directes ou indirectes) et les lignes suivies d'une barre des inhibitions. Alors que la GTPase Rho, la Rho-kinase et la Myosine II (chaîne légère et chaîne lourde) sont essentielles à l'élongation de la cellule, les autres constituants de la voie de signalisation Rho tels que Pebble, la kinase Citron ou la formine Diaphanous ne le sont pas.

D'après Glotzer, 2001.

33. Contraction équatoriale et relaxation polaire en anaphase B.

La contraction équatoriale couplée à la relaxation polaire conduit les cellules à acquérir une forme de « cacahuète », caractérisée par des surfaces membranaires convexes aux pôles et concaves à l'équateur. Les mécanismes moléculaires à l'origine de ce remodelage du cortex cellulaire en anaphase sont mal compris et semblent différer légèrement en fonction du type cellulaire étudié. Certains de ces mécanismes ont été conservés au cours de l'évolution, et un modèle répandu est que les microtubules du fuseau mitotique spécifient la localisation de l'anneau d'Actomyosine. Le fuseau est également nécessaire à l'assemblage de l'anneau d'Actomyosine au cortex, dont la contraction est requise pour l'ingression du sillon [71]. Cette communication entre les microtubules et le cytosquelette d'Actine contribue certainement à la contraction équatoriale et la relaxation polaire.

331. Modèle de contraction équatoriale et de relaxation polaire médiées par le fuseau mitotique.

Il a été montré que des signaux « positifs », c'est-à-dire stimulant la contraction corticale, sont délivrés préférentiellement au cortex équatorial par des microtubules. Parmi ces signaux, la voie de signalisation Rho, présentée précédemment, joue un rôle majeur en régulant l'activation de la Myosine et la polymérisation de l'Actine [72], [73], [74]. Rho et plusieurs de ses régulateurs s'accumulent à l'équateur et sont requis pour la mise en place et la contraction de l'anneau d'Actomyosine [75], [76], [77], [78], [79]. Le PI(4,5)P2 est également enrichi à la membrane équatoriale, et est requis pour la contraction de l'anneau d'Actomyosine et la stabilité du sillon de clivage (cf. 53). Cependant, la séquestration du PI(4,5)P2 ou l'inhibition de son hydrolyse n'abolit pas l'initiation du sillon de clivage, suggérant que le PI(4,5)P2 ne constitue pas en soi le signal « originel » pour la formation du sillon. Le recrutement et l'activation de RhoA par les microtubules préférentiellement à l'équateur reste l'évènement (connu) le plus précoce pour l'initiation du sillon de clivage.

3311. Modèle de contraction équatoriale chez les mammifères.

Chez les mammifères, dès la séparation des chromosomes, les microtubules polaires s'associent pour former le fuseau central entre les deux lots de chromosomes. L'assemblage de ce fuseau central requiert le complexe centralspindle, constitué de la kinésine MKLP1 (kinésin like protein) et de la RhoGAP MgcRacGAP, qui catalyse l'agrégation des microtubules entre eux [80], [81], [77] (*figure 25*). MKLP1 est d'ailleurs essentielle à l'ingression du sillon de clivage dans de nombreux modèles cellulaires [82], [83]. Elle

participe à la fois à l'agrégation des microtubules, et au transport le long des microtubules de facteurs favorisant la formation et/ou à la contraction de l'anneau d'Actomyosine. La centralspindle recrute ainsi la RhoGEF ECT2 pour former un complexe (*figure 25*) qui va activer la GTPase Rho [64] (*figures 24 et 25*).

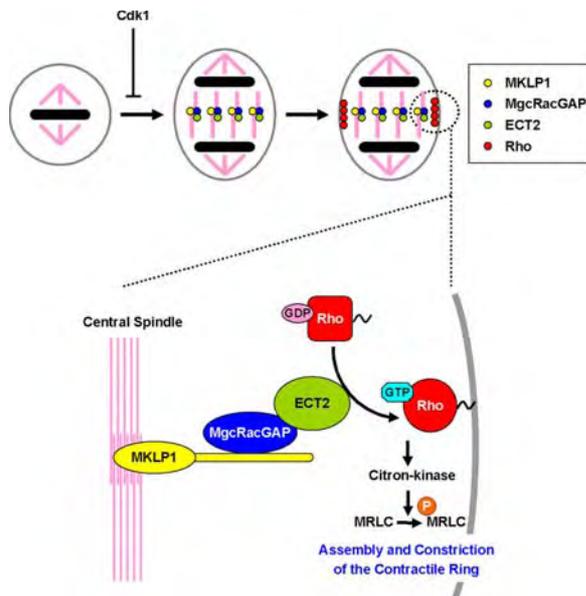


Figure 25 : la voie de signalisation médiée par Rho constitue un signal microtubules-dépendant pour positionner le sillon de clivage.

Sur les microtubules du fuseau central (en rose) la kinésine MKLP-1 (en jaune) s'associe à la Rho-GAP MgcRacGAP (en bleu) pour former le complexe Centralspindle. Celui-ci recrute la RhoGEF ECT2 (en vert) qui va permettre l'activation de la GTPase Rho (en rouge) en favorisant l'échange du GDP par une molécule de GTP. Rho est alors transloquée à la membrane plasmique la plus proche, c'est-à-dire la membrane équatoriale, où elle peut activer plusieurs de ses effecteurs dont la kinase Citron, elle-même capable d'activer la Myosine II en phosphorylant sa chaîne légère. *D'après Kamijo & al, 2006.*

Rho-GTP est alors transloquée à la membrane plasmique la plus proche, c'est à dire à l'équateur de la cellule (*figure 25*). Via l'activation de la Rho-kinase à l'équateur, Rho promeut la polymérisation de l'Actine au cortex équatorial en activant entre autres la LIM kinase (*figure 24*). Celle-ci inactive à son tour la Cofiline [84], stabilisant ainsi les filaments d'Actine (cf. 212). La Rho-kinase participe également à l'activation de la Myosine par phosphorylation de ses chaînes légères [85] (cf. 213) (*figure 24*). L'activité motrice de la Myosine II génère la force responsable du glissement des filaments d'Actine les uns par rapport aux autres, pour la contraction de l'anneau d'Actomyosine et le cintrage de la cellule à son équateur (cf. 213). L'inhibition de MKLP1, de MgcRacGAP ou d'ECT2 conduit à une délocalisation de la GTPase Rho, qui n'est plus enrichie ni activée au cortex équatorial. Il s'en suit un défaut de formation de l'anneau d'Actomyosine, conduisant à un défaut de cytokinèse et/ou à l'aneuploïdie cellulaire. L'anneau d'Actomyosine est très dynamique durant l'ingression du sillon, en raison d'un rapide turn-over de l'Actine et de la Myosine [86], [87]. En effet, il a été démontré que la dépolymérisation de l'Actine est nécessaire à l'ingression du sillon. Bien que les mécanismes précis de cette dépolymérisation de l'Actine soient controversés, il semblerait que des facteurs tels que la Cofiline participent à l'ingression du sillon en jouant sur la dynamique de polymérisation de l'Actine, de même que le PI(4,5)P2 (cf. 53).

Dans les cellules de mammifère, le fuseau central est donc important pour localiser et induire la formation du sillon de clivage. Ceci peut expliquer pourquoi une barrière physique placée entre le fuseau central et le cortex inhibe l'ingression du sillon de clivage dans des cellules en culture [88].

3312. Modèle de contraction équatoriale chez la drosophile.

Dans les cellules de drosophile, les microtubules spécifient également la position du sillon de clivage par une voie de signalisation Rho-dépendante. Comme chez les mammifères, la centralspindle, constituée de Pavarotti (l'orthologue de MLKP1) et de RacGAP50C (l'orthologue de MgcRacGAP), interagit aussi avec l'orthologue d'ECT2, la RhoGEF Pebble. Dans des drosophiles mutantes pour Pavarotti, les microtubules ne s'associent pas pour former le fuseau central et les composants de l'anneau d'Actomyosine ne s'assemblent pas, conduisant à un défaut de cytokinèse [89]. Par contre, à l'inverse d'ECT2 qui colocalise avec la centralspindle sur le fuseau central, Pebble est localisée au cortex équatorial [90]. Pebble n'interagit donc pas avec la centralspindle du fuseau central mais avec les complexes de centralspindle localisés sur les microtubules astraux, et contribue à l'activation de Rho au cortex équatorial. Lié au GTP, Rho interagit avec Diaphanous et la régule positivement [11]. Essentielle à la cytokinèse, Diaphanous permet la nucléation des filaments d'Actine non branchés [9] [10], [11]. Rho-GTP favorise aussi l'activation de la Myosine II via la Rho-kinase et Citron-kinase [91]. Dans ce modèle cellulaire, la spécification du sillon de clivage dépend majoritairement des microtubules astraux. Cependant, des cellules mutantes de drosophile *asterless*, qui ne forment pas de microtubules astraux, sont toujours capables de se diviser. Dans ces cellules, le fuseau central se forme et est suffisant pour induire la formation et la contraction de l'anneau d'actomyosine [92].

3313. Combinaison de signaux positifs et négatifs.

En fonction des types cellulaires, la spécification du sillon de clivage par l'activation de Rho est contrôlée soit par les microtubules astraux, soit par les microtubules du fuseau central [93]. Dans tous les cas, les microtubules induisent la formation de l'anneau d'Actomyosine via une activation localisée de Rho, préférentiellement au cortex équatorial. Le fuseau mitotique délivre donc des signaux stimulant la contraction corticale, à l'équateur (*figure 26*). Des signaux « négatifs », libérés par les microtubules astraux situés à proximité du cortex polaire, pourraient quant à eux induire une relaxation du cortex (*figure 26*). De tels signaux ont été identifiés chez le Xénope [94].

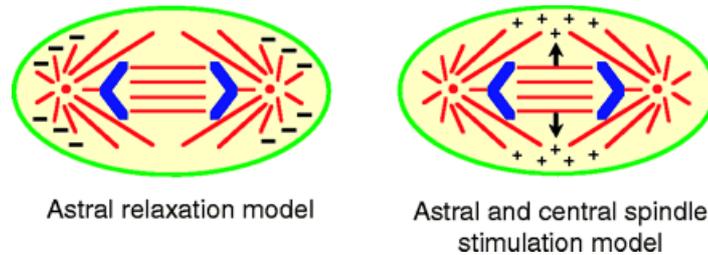


Figure 26 : modèles de relaxation polaire ou de stimulation équatoriale par les microtubules.

Dans le modèle de gauche, les microtubules astraux qui contactent le cortex polaire délivrent un signal de relaxation, restreignant la contraction à l'équateur de la cellule. Dans le second modèle (à droite), les microtubules astraux et du fuseau central délivrent un signal de contraction à l'équateur. Ces deux modèles ne sont pas exclusifs. Les microtubules sont en rouge, la membrane plasmique en vert et l'ADN en bleu.

D'après D'Avino & al, 2005.

En fonction du modèle cellulaire, la contraction équatoriale et la relaxation polaire sont induites par la délivrance de signaux positifs à l'équateur et/ou de signaux négatifs aux régions polaires (*figure 26*) [95]. Ces deux modèles ne sont pas incompatibles, et convergent vers le rôle clé des microtubules pour la localisation et l'ingression du sillon de clivage.

332. Modèle de contraction équatoriale et de relaxation polaire médiées par un flux cortical d'Actine et de Myosine.

Durant l'anaphase, des filaments d'Actine pré-existants sont transportés des régions polaires vers le sillon de clivage grâce à un flux cortical, et participent à l'enrichissement de l'Actine à l'équateur. Dès 1943, des mouvements corticaux ont été observés dans des œufs d'oursin, grâce à l'analyse du mouvement de particules de carbone fixées sur le cortex des œufs durant l'ingression du sillon [96]. Les œufs de Xénope constituent un bon modèle pour étudier la mitose, leur taille importante facilitant les micromanipulations. La microinjection d'Actine globulaire fluorescente a permis d'observer la dynamique de l'Actine lors de l'anaphase. Dans ce modèle, l'enrichissement de l'Actine à l'équateur provient pour moitié de la synthèse locale de nouveaux filaments, et pour moitié d'un flux de filaments d'Actine pré-existants des pôles vers l'équateur [97]. Un tel flux d'Actine a été aussi mis en évidence dans des cellules de mammifères [86, 98, 99]. Cao & al ont montré dans des cellules épithéliales de rat que l'enrichissement de l'Actine à l'équateur provient majoritairement de filaments d'Actine pré-existants, qui se déplacent des régions polaires vers l'équateur [99] [98] (*figure 27*). Ce flux cortical d'Actine a également été mis en évidence grâce à l'observation des trajectoires de billes recouvertes de Concanavaleine A fixées sur le cortex

cellulaire [100]. Enfin, un flux cortical de Myosine a été observé des pôles vers l'équateur dans des cellules 3T3 en anaphase [101] ainsi que dans des œufs de Xénope [97].

Figure 27 : modèle hypothétique représentant les mouvements d'Actine durant l'ingression du sillon de clivage.

Les filaments d'Actine cytoplasmiques s'associent avec le cortex polaire (têtes de flèche) puis migrent en direction du sillon de clivage (flèches courbes). Les filaments se dissocient ensuite du cortex et deviennent cytoplasmique (petites flèches). Un éventuel flux cytoplasmique permettrait le déplacement des filaments d'Actine en direction du cortex polaire (flèches surmontées d'un point d'interrogation).

D'après Cao & al, 1990.



333. Les blebs polaires : des déformations furtives et dynamiques.

Observé pour la première fois en 1883, le blebbing conduit à des déformations membranaires transitoires, rapidement rétractés. Bien que ce blebbing soit observé dans 90% des mitoses [66], ni les causes du blebbing mitotique, ni les mécanismes de leur rétraction ne sont bien caractérisées.

La mécanique des fluides prédit que si la pression du cytoplasme sur le cortex est trop forte, la courbure de la membrane plasmique aux pôles n'est pas suffisante pour résister à cette augmentation de pression, conduisant à une instabilité corticale. La loi de Laplace : $T = \Delta P r$, stipule que pour rester à l'état d'équilibre le rayon de la courbure membranaire (r) doit diminuer au fur et à mesure que la pression augmente (ΔP), T représentant la tension. Bien que d'autres paramètres doivent être pris en compte, tel que la viscosité du cytoplasme, il est néanmoins probable qu'en anaphase la pression intracellulaire due à la contraction de l'anneau augmente plus vite que le rayon de courbure aux pôles diminue. Ainsi, le sillon de clivage se met en place dans un environnement caractérisé par une instabilité corticale. Celle-ci peut se traduire par une rupture du cytosquelette d'Actine, ou par une dissociation des filaments d'Actine de la membrane plasmique [102], [103, 104].

D'après la littérature – relativement pauvre et ancienne - traitant de ce sujet, les blebs mitotiques seraient donc des extrusions membranaires générés par une augmentation locale de la pression cellulaire [105], [106]. L'extrusion se produirait là où l'énergie de liaison entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'Actine ne peut contenir l'augmentation de pression intracellulaire induite par la contraction de l'anneau d'Actomyosine. Le cortex cellulaire étant plus fragile aux pôles de la cellule, en raison notamment de la délocalisation

progressive de l'Actine et de la Myosine vers l'équateur, ceci pourrait expliquer pourquoi les blebs apparaissent majoritairement aux pôles des cellules mitotiques, lorsque l'anneau d'Actomyosine commence à se contracter jusqu'à ce que l'ingression du sillon soit totale.

Les blebs mitotiques sont-ils simplement la conséquence, passive, d'une instabilité corticale ? Il est possible que ces blebs participent également à la stabilisation du fuseau mitotique au centre de la cellule. Une étude récente met en évidence que la formation de blebs de taille excessive aux régions polaires perturbe la localisation du fuseau mitotique lors de leur rétraction [107]. Même si les mécanismes impliqués dans la rétraction des blebs mitotiques restent à caractériser, cette étude montre que l'Actine filamenteuse est progressivement recrutée au cortex des blebs lors de leur rétraction [107].

En comparaison, la littérature relative aux blebs interphasiques est plus riche et récente. Une rupture du cytosquelette d'Actine ou un décollement de celui-ci de la membrane plasmique peut conduire à la formation d'un ou plusieurs blebs (*figure 28*). Lors de leur croissance, ces blebs sont dépourvus d'Actine corticale, puis le cortex est reconstitué par l'arrivée successive de l'Ezrine, une protéine de la famille ERM, suivie de l'Actine puis de plusieurs protéines capables de lier l'Actine dont la Myosine II (*figure 28*) [108], [106], [109], [110], [111]. Ces études montrent également que la rétraction des blebs interphasiques est dépendante des propriétés contractiles de l'Actomyosine.

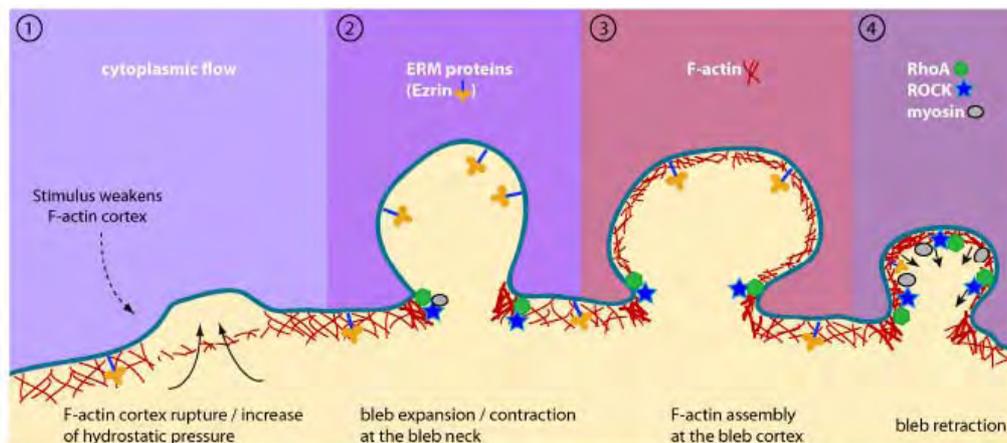


Figure 28 : schéma de la formation et de la rétraction d'un bleb interphasique.

(1) un flux cytoplasmique excessif peut conduire à une rupture du cytosquelette d'Actine à l'origine d'un bleb. Celui-ci grossit, puis (2) les protéines ERMs telles que l'Ezrine sont recrutées au cortex des blebs, suivies par (3) l'Actine filamenteuse et (4) des protéines favorisant la contractilité du cortex telles que RhoA, la Rho-kinase ou la Myosine II.

D'après Fackler & al, 2008

Pour résumer cette troisième partie de l'introduction, les modifications successives de la forme du cortex et de ses propriétés mécaniques sont contrôlées par de multiples mécanismes dont nous venons de voir les principaux. Bien que le cytosquelette d'Actine, les microtubules et les voies de signalisation dépendantes de la GTPase RhoA (ou Rho1 chez la drosophile) soient au cœur de ce remodelage cortical, l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans la morphogénèse des cellules mitotiques est loin d'être compris et de nombreux autres acteurs restent à identifier. Ainsi, en 2008, l'équipe de F.Payre et celle de B.Baum ont mis en évidence que l'activation des protéines ERMs à l'entrée en division est essentielle à l'arrondissement des cellules et au maintien de la stabilité corticale.

IV. Les protéines ERMs et leur(s) rôle(s) dans la polarité et la morphogénèse cellulaire.

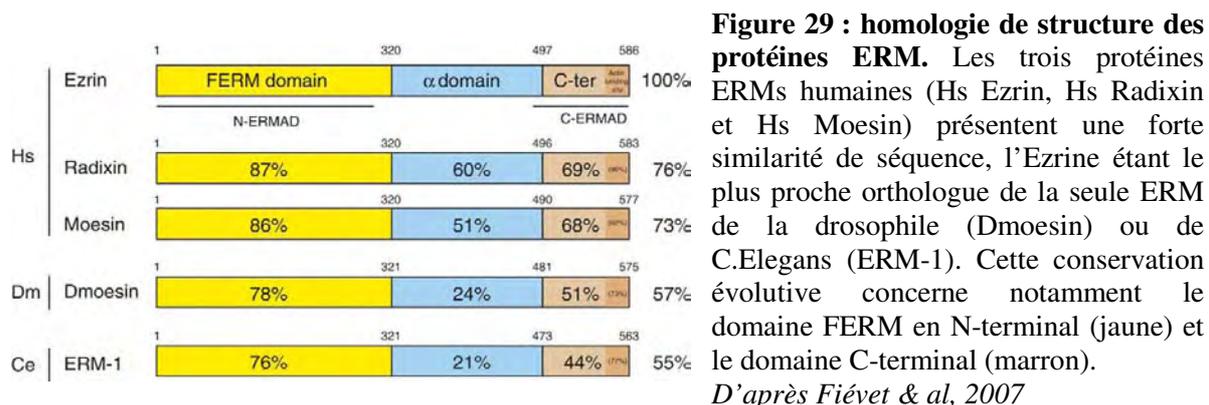
Les protéines de la famille ERM sont connues pour réguler le lien entre l'Actine filamenteuse et la membrane plasmique. Bien qu'elles aient été découvertes il y a plus de trente ans chez les vertébrés, l'implication de ces protéines dans la division cellulaire est récente [47], [63]. Les mécanismes de leur régulation, ainsi que leur(s) rôle(s) dans la division cellulaire, restent mal connus. L'étude des protéines ERMs pour la morphogénèse de nombreux types cellulaires, dont les entérocytes et les cellules à stéréocils, peut aider à mieux comprendre les mécanismes du remodelage cortical.

41. Des cellules de drosophile pour étudier les protéines ERMs.

Il existe trois gènes codant des protéines ERMs chez les mammifères, appelées Ezrine, Radixine et Moésine. L'inactivation individuelle des trois ERMs chez la souris ne provoque pas de létalité prénatale, suggérant une redondance fonctionnelle de celles-ci au cours du développement. Après la naissance, la Radixine étant la principale protéine ERM exprimée dans le foie, les souris KO pour la Radixine développent des pathologies de cet organe accompagnées d'une altération morphologique des canaux biliaires [112]. Ces souris souffrent également de surdité à l'âge adulte, due au fait qu'à la naissance la Radixine et l'Ezrine sont exprimées dans les cellules formant les stéréocils puis seule la Radixine est exprimée. L'Ezrine, quant à elle, est la protéine ERM majoritaire des cellules intestinales, et est requise pour la formation des microvillosités des entérocytes. Les souris qui n'expriment pas l'Ezrine meurent rapidement après la naissance, et présentent de graves anomalies de l'épithélium intestinal [113]. Enfin, les souris KO pour la Moésine ne présentent aucune anomalie apparente [114]. De par leur co-expression dans la plupart des cellules et leur

probable redondance fonctionnelle, il reste difficile d'identifier les régulateurs et effecteurs des protéines ERMs chez les mammifères.

Le génome des invertébrés tels que la drosophile, l'oursin ou encore le nématode ne présente qu'un seul gène ERM. Chez la drosophile, l'unique orthologue des ERMs, la dMoésine, présente 57% d'identité avec l'Ezrine humaine (*figure 29*), montrant la forte conservation évolutive de cette famille de protéines.



La drosophile représente un modèle intéressant pour l'étude des ERMs, notamment au cours du développement et pour la division cellulaire [63]. Cette dernière étude a permis de révéler la dynamique de localisation des ERMs à chacune des phases mitotiques, d'abord isotrope puis anisotrope [63]. **Quels sont les mécanismes régulateurs à l'origine de la distribution anisotrope de la dMoésine en anaphase et télophase ?** L'implication de la dMoésine dans la division cellulaire a simultanément été découverte par l'équipe de B.Baum, grâce à l'utilisation de la lignée S2R+, une autre lignée cellulaire de drosophile [47]. **Quel est le rôle exact de la dMoésine dans le processus mitotique ?**

42. Activation des ERMs et modification conformationnelle.

421. Structure des protéines ERMs.

Les protéines ERMs sont constituées d'un domaine FERM N-terminal capable de lier différentes protéines membranaires, ainsi que le PI(4,5)P2 [3] (*figure 30*). La cristallisation de ce domaine, couplée à des expériences de diffraction aux rayons X, a révélée sa structure composée de trois sous-domaines globulaires F1, F2 et F3 [115]. Parmi les 300 acides aminés du domaine FERM, quatre clusters de lysine ont été identifiés comme nécessaires à la liaison du domaine FERM à la membrane plasmique [116]. Le sous-domaine F3 présente par ailleurs la particularité d'avoir une homologie structurale avec le

domaine dit « PH » (pour Plekstrin-Homology) [115], connu pour lier spécifiquement le PI(4,5)P2. Ce domaine FERM est suivi d'une région centrale prédite pour avoir une structure hélicoïdale, et enfin d'un domaine C-terminal capable de lier l'Actine filamenteuse (*figure 30*). Alors que les domaines N- et C-terminaux ont été bien conservés au cours de l'évolution, la région hélicoïdale présente une évolution plus rapide (*figure 29*). Cette région contribue à la modification conformationnelle de la protéine, conduisant respectivement à une ouverture ou à un repliement de la protéine suite à une interaction intramoléculaire entre le domaine FERM et le domaine C-terminal ou un éloignement de ces deux domaines. Les protéines ERMs cyclent donc entre une forme ouverte et une forme dormante fermée.

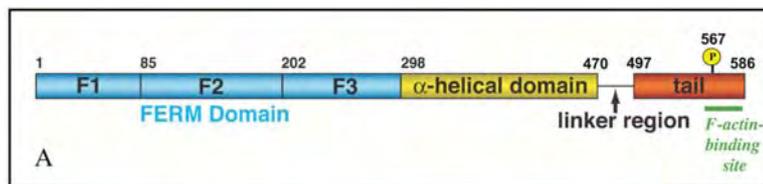


Figure 30 : domaines communs aux différentes protéines ERMs.

Les protéines ERMs sont constituées de trois domaines. Un domaine FERM (bleu) composé de trois sous-domaines F1, F2 et F3, un domaine central (jaune) constitué d'une α -hélice, et d'un domaine C-terminal (rouge) dans lequel se trouve la thréonine dont la phosphorylation stabilise les ERMs dans leur conformation ouverte.

D'après Fehon, 2010

422. L'activation des protéines ERMs, un processus en plusieurs étapes.

Une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes qui régulent l'activité des protéines ERMs date de 1995, lorsque l'équipe de Furthmayr met en évidence que la Moésine est phosphorylée sur la thréonine 558 lorsque les plaquettes sont activées [117]. Ce résidu thréonine, localisé dans le domaine C-terminal, est bien conservé chez les paralogues (Ezrine T-576 et Radixine T-564) et orthologues (dMoésine T-559) et sa phosphorylation est une marque de leur activation. Le modèle actuel de l'activation des protéines ERMs propose qu'elle est due à une modification de leur conformation [118], [115] et nécessiterait au moins deux étapes.

Dans un premier temps, la liaison des protéines ERMs au PI(4,5)P2 induirait une modification conformationnelle de ces protéines [3, 116, 119]. Plus précisément, l'interaction se ferait entre la tête polaire du PI(4,5)P2 et une région structurale localisée entre les sous-domaines F1 et F3 des ERMs [120]. Cette ouverture conformationnelle, par éloignement des

domaines FERM et C-terminal, aurait pour conséquence de démasquer les sites capables de lier l'Actine filamenteuse, permettant aux ERMs de relier le cytosquelette d'Actine à la membrane plasmique [121] (*figure 31*). Cette interaction est labile, les protéines ERMs cyclant rapidement entre cette forme ouverte et la forme inactive. La liaison des ERMs au PI(4,5)P2 favorise aussi l'accessibilité de la thréonine C-terminale à une ou plusieurs kinases [122], [123].

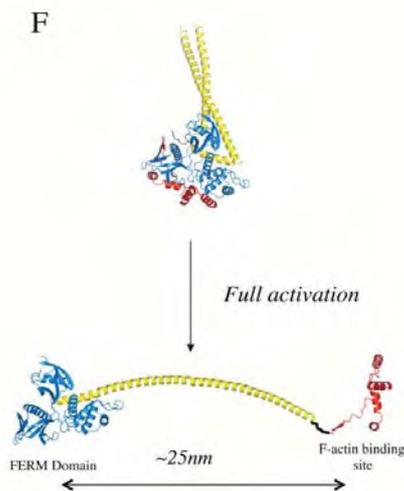


Figure 31 : modèle d'activation des protéines ERMs.

Sous forme non phosphorylée les ERMs adoptent une conformation fermée dans laquelle le domaine FERM (bleu) interagit avec le domaine de liaison à l'Actine-F (rouge). Suite à la liaison du domaine FERM au PI(4,5)P2, la conformation de la protéine est modifiée permettant une (pré)ouverture de celle-ci. Les domaines FERM et de liaison à l'Actine ne sont plus capables d'interagir entre eux, s'éloignant d'environ 25nm grâce à une modification conformationnelle de la région centrale (en jaune) constituée d'une α -hélice.

D'après Fehon, 2010

Dans un deuxième temps, la phosphorylation du résidu thréonine introduit une charge négative supplémentaire dans le domaine C-terminal, qui favoriserait l'éloignement entre les domaines FERM et C-terminal [115, 123]. Ainsi, les ERMs stabilisées pourraient donc lier stablement l'Actine filamenteuse à la membrane plasmique [121]. Chez les vertébrés, de nombreuses kinases ont la capacité de phosphoryler cette thréonine, au moins *in vitro*, incluant la PKC θ [124], NF- κ β -inducing kinase (= NIK ou MAP3K14), MST4 [125] ou encore LOK (=STK10) [126]. Chez la drosophile, la kinase Slik est nécessaire à la phosphorylation de la dMoésine, notamment à l'entrée en division [47] [63] [127], [128].

43. Les ERMs : des régulateurs de la polarité corticale et de la morphogénèse.

Bien que l'implication des ERMs dans la morphogénèse cellulaire des cellules mitotiques soit récente [47, 63], ces protéines sont connues depuis de nombreuses années pour leur rôle dans la morphogénèse de différents types cellulaires, caractérisés par des structures polarisées, riches en Actine-F. Ainsi, l'Ezrine, initialement découverte dans des cellules épithéliales d'intestin de poulet, est essentielle à la mise en place et à l'organisation des microvillosités apicales des entérocytes [129]. De même, la Radixine [130] s'accumule et est nécessaire à la formation et/ou au maintien des stéréocils des cellules de l'oreille interne [131]. L'absence de la dMoésine dans les cellules de l'œil chez la drosophile conduit

à une morphologie altérée de ces cellules. Alors qu'en condition sauvage ces cellules forment des structures riches en Actine filamenteuse appelées rhabdomères, l'inhibition de la dMoésine conduit à une morphogénèse anormale, avec une désorganisation des filaments d'Actine situés sous la membrane plasmique. Les protéines ERM sont donc essentielles à la morphogénèse du domaine apical des cellules présentant des structures riches en Actine filamenteuse, probablement en raison de leur capacité à interagir simultanément avec la membrane plasmique et le cytosquelette d'Actine.

Par ailleurs, plusieurs études montrent le rôle des protéines ERM et de leur distribution polarisée dans la migration invasive de type blebs-dépendante (*figure 32*) [111], [132], [133], [134].

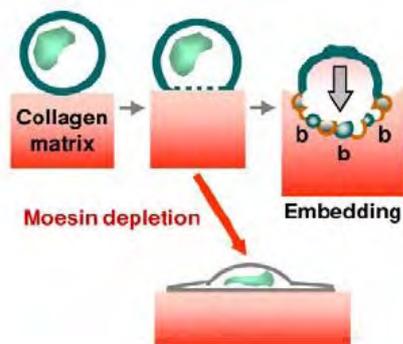


Figure 32 : distribution de la Moésine dans une cellule humaine lors de la migration invasive en trois dimensions.

En absence de migration ces cellules sont sphériques et présentent une distribution corticale uniforme de la Moésine (bleu-vert). Par la suite, la distribution anisotrope de la Moésine polarise la cellule, en permettant la formation d'un dôme d'Actomyosine au pôle apical de la cellule et simultanément un cortex plus dynamique au pôle basal, caractérisé par la présence d'une multitude de blebs (orange). Ces blebs sont nécessaires à la migration invasive. En absence de Moésine, la polarisation corticale ne se produit pas, prévenant la formation des blebs et la migration cellulaire. *Estecha & al, 2009*

La division et la migration présentant de nombreuses similitudes de par les voies de signalisation activées, la découverte de régulateurs ou d'effecteurs des ERM dans le processus de migration cellulaire pourrait permettre d'apprendre sur la régulation et/ou le(s) rôle(s) des ERM en mitose et inversement.

En conclusion, en participant à la création d'un différentiel de plasticité du cortex cellulaire, les protéines ERM participent à la polarité cellulaire dans différents processus biologiques qui engagent un remodelage cortical tels que la migration cellulaire. L'équipe a aussi démontré que l'activation de ces protéines est essentielle à l'intégrité de la division cellulaire, et que cette activation est dépendante de la kinase Slik. De nombreuses questions restent ouvertes, relatives aux rôle(s) des ERM en mitose, à l'identification des régulateurs de leur activation ou de leur distribution lors de la division cellulaire. Le PI(4,5)P2 étant un phosphoinositide participant à l'activation des ERM, nous aborderons dans la partie suivante l'importance des membranes et plus particulièrement du PI(4,5)P2 dans la morphogénèse des cellules mitotiques.

V. Importance des membranes et du PI(4,5)P2 dans le processus mitotique.

51. Quand la fusion orientée de vésicules avec la membrane plasmique participe à l'ingression du sillon de clivage.

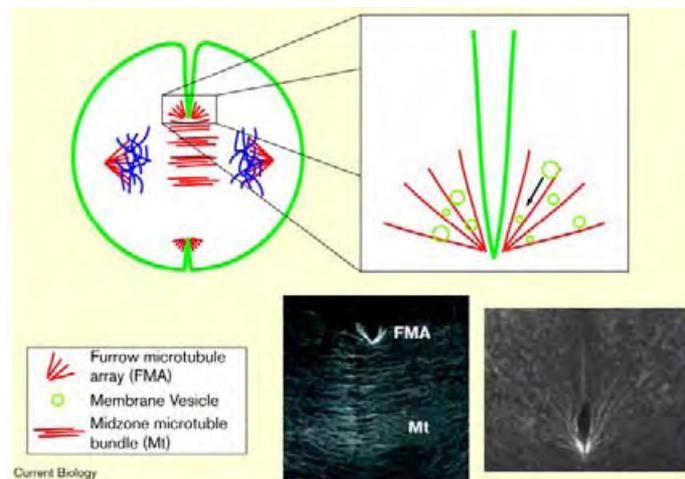
511. Fusion membranaire lors de la 1^{ère} mitose de l'embryogénèse

Dans l'embryon de Xénope ou d'oursin, plusieurs études mettent en évidence l'ajout de nouvelles membranes provenant de l'appareil de Golgi, à proximité du sillon de clivage [135], [136], [137], [138], [139], [140]. A proximité du sillon se trouve une structure composée de microtubules, le FMA (Furrow Microtubule Array) [141], [142] (*figure 33*), nécessaire au transport des vésicules membranaires en direction du cortex [138]. La dépolymérisation des microtubules du FMA bloque l'ajout de nouvelles membranes à l'équateur, et conduit à une régression du sillon de clivage. Le FMA a également été observé dans des embryons de poisson zèbre, où la dépolymérisation des microtubules par traitement au nocodazole bloque aussi l'ajout de nouvelles membranes à l'équateur, et conduit à une régression du sillon de clivage ne permettant pas une anaphase B correcte [143]. Le transport de nouvelles membranes microtubules (FMA)-dépendant est donc important pour la formation et la fonctionnalité du sillon de clivage.

Figure 33 : les microtubules du FMA dirigent l'insertion de membranes au sillon de clivage.

Les microtubules (rouge) du FMA (encart) permettent un transport orienté de vésicules membranaires (vert clair) en direction de la membrane plasmique (vert) au sillon de clivage.

D'après Straight & al, 2000.



Dans ces conditions, le blocage de la cytokinèse pourrait provenir d'une surface membranaire insuffisante pour la formation des deux cellules filles. Cet apport de vésicules membranaires est dépendant des microtubules, or le fuseau mitotique est souvent éloigné du cortex en raison de sa faible taille comparée à la taille des cellules embryonnaires. Le FMA constituerait donc un système supplémentaire pour apporter de la membrane à l'équateur, et pourrait être le fruit d'une adaptation des cellules embryonnaires qui requièrent une insertion de membrane plus importante que des cellules en culture. Ces dernières ne

présentent pas de FMA, cependant plusieurs études mettent en évidence un apport de membrane en provenance du cytoplasme, dont la fusion avec la membrane équatoriale est nécessaire à l'abscission du pont intercellulaire.

512. Rôles des fusions membranaires dans la division cellulaire.

Dans la plupart des cellules en culture, l'inhibition du trafic membranaire conduit principalement à un défaut d'abscission en fin de télophase [144], [145], [146], [147]. Cette abscission se produit normalement lorsque l'ingression du sillon de clivage est totale, et que les deux cellules filles ne sont reliées plus que par le pont intercellulaire. L'abscission est un processus complexe (et reste mal caractérisé), qui requiert une action coordonnée du cytosquelette d'Actine, des microtubules et des systèmes membranaires pour permettre la séparation « physique » des deux cellules filles. Bien que l'accumulation de vésicules membranaires au pont intercellulaire ait été observée dès 1977 par microscopie électronique [148], leur nature et leur(s) rôle(s) fonctionnel(s) en mitose reste encore débattus. Ce trafic implique surtout les vésicules d'endocytose et les endosomes. En utilisant des cellules HeLa, Schweitzer *et al* montrent qu'en télophase la transférine, un marqueur de l'endocytose, est internalisé préférentiellement aux pôles et est recyclée à proximité de la région équatoriale, suggérant une polarité du trafic vésiculaire [149]. L'inhibition de protéines impliquées dans l'endocytose, telles que la Clathrine ou encore la Dynamine, conduit à des défauts d'abscission dans les cellules de drosophile et de mammifère [144, 149], [149] [150], [151]. Plusieurs études soutiennent également l'importance du trafic des endosomes et de leur enrichissement à proximité du pont intercellulaire pour l'abscission [149], [147], [152]. Cette polarisation du trafic vésiculaire des pôles vers le pont intercellulaire semble être un mécanisme évolutivement conservé nécessaire à l'abscission [153], [152]. Parmi les régulateurs clefs du trafic membranaire se trouvent les GTPases de la famille Rab, dont la protéine Rab35 [154], [155]. Celle-ci est nécessaire à l'abscission, en contrôlant le trafic des endosomes et leur fusion (recyclage) avec la membrane plasmique. L'inhibition de Rab35 conduit à une accumulation de vésicules cytoplasmiques riches en récepteurs de la transférine, qui proviennent vraisemblablement de fusions entre endosomes en raison d'un recyclage vers la membrane plasmique réduit [146]. Nous verrons ultérieurement que ce trafic orienté des endosomes vers la membrane plasmique du pont intercellulaire participe localement à la régulation du PI(4,5)P2 (cf. 52).

De façon similaire au transport des vésicules par les microtubules du FMA dans les cellules embryonnaires, le transport des endosomes et leur accumulation au pont intercellulaire seraient également dépendants des microtubules. Une analyse protéomique

des composants du midbody de cellules humaines montre un enrichissement de la kinésine-1 au niveau du midbody [156]. Cette kinésine pourrait favoriser la migration des endosomes de recyclage en direction du pont intercellulaire, par un transport dépendant des microtubules et orienté vers leur extrémité positive. Alors que l'apport de membranes à la membrane plasmique équatoriale par des vésicules intracellulaires est nécessaire à l'ingression du sillon de clivage dans les cellules embryonnaires de taille importante, la régulation du trafic membranaire constitué d'endosomes et de vésicules d'endocytose semble générale et essentielle à l'abscission. Ces deux processus requièrent une organisation spatiale des microtubules, ainsi que la présence de protéines motrices de type Kinésine dont certaines restent à identifier.

A l'image des vésicules transportées par le FMA, ce trafic vésiculaire orienté vers le lieu de l'abscission a-t-il pour principale fonction une augmentation de l'aire membranaire à l'interface entre les deux futures cellules filles ? Constitue t-il un moyen de transport efficace pour délivrer des protéines nécessaires au mécanisme d'abscission spécifiquement à la membrane plasmique du pont intercellulaire ? Ou encore représente t-il un système permettant de moduler la composition lipidique de la membrane plasmique ? Il a clairement été démontré qu'en début de division le volume cellulaire diminue en raison d'un blocage du recyclage des endosomes vers la membrane plasmique alors que le processus d'endocytose se poursuit, puis que l'aire membranaire augmente en anaphase grâce à la reprise des fusions membranaires entre endosomes de recyclage et membrane plasmique [147], [157]. Cependant, en plus de contrôler la surface membranaire, le transport orienté de ces vésicules participe également à la régulation de la composition lipidique de la membrane plasmique. La composition de celle-ci est aussi importante que la régulation de son aire pour l'intégrité de la division cellulaire. Par exemple, le PI(4,5)P₂, un phosphoinositide de la membrane plasmique [158], est connu pour jouer de multiples rôles dans la division cellulaire (cf. 53). Sa distribution, synthèse et hydrolyse doivent être finement régulées afin de permettre aux cellules de se diviser correctement. L'équipe d'Arnaud Echard a récemment mis en évidence que la GTPase Rab35 contrôle le taux de PI(4,5)P₂ à la membrane plasmique du pont intercellulaire en régulant le trafic des endosomes de recyclage [146]. Ces endosomes, pourraient ainsi participer à la régulation de la distribution du PI(4,5)P₂ dans les cellules mitotiques. Ces travaux montrent de plus que la mutation de la protéine Ocr1, un effecteur de Rab35 dont nous reparlerons par la suite, conduit à un défaut d'abscission associé à un excès de PI(4,5)P₂ au pont intercellulaire.

52. Régulation du PI(4,5)P2 en interphase et en mitose.

Le PI(4,5)P2 est un lipide appartenant à la famille des phosphoinositides, qui représentent entre 10 et 15% des phospholipides totaux de la membrane plasmique. Le phosphatidylinositol (PI) est de loin le phosphoinositide majeur de la membrane plasmique, et constitue le précurseur des autres phosphoinositides. En effet, la phosphorylation d'un, de deux ou de trois de ses groupements hydroxyles conduit respectivement à la formation des phosphatidylinositol monophosphates (PI3P, PI4P ou PI5P), des phosphatidylinositol bisphosphates (PI(3,4)P2, PI(3,5)P2 ou PI(4,5)P2) et du phosphatidylinositol trisphosphate (PI(3,4,5)P3). Le PI(4,5)P2, qui nous intéresse plus particulièrement, représente à lui seul seulement 10% des phosphoinositides totaux. Il est majoritairement produit par les PI4P 5-kinases, qui phosphorylent le PI(4)P sur son groupement hydroxyle numéro 5. La phosphatase Pten participe également mais de façon plus modérée à la production du PI(4,5)P2, en déphosphorylant le groupement hydroxyle numéro 3 du PI(3,4,5)P3. Le taux de PI(4,5)P2 peut au contraire être diminué soit par phosphorylations / déphosphorylations de ses groupements hydroxyles, soit par son hydrolyse médiée par les phospholipases.

En raison des multiples voies de signalisation par lesquelles le PI(4,5)P2 modifie directement ou indirectement l'Actomyosine (cf. 53), le contrôle de la production, l'hydrolyse, et la distribution de ce phospholipide à chaque étape de la division cellulaire peut influencer sa progression.

Chez les mammifères, il est bien établi que le PI(4,5)P2 s'accumule à la membrane équatoriale à la transition métaphase-anaphase [159], [160], [161]. Cet enrichissement à l'équateur, couplé à son hydrolyse par les phospholipases C, est nécessaire à l'ingression du sillon de clivage et à la séparation des deux cellules filles. En interphase la phosphorylation du PI(4)P en PI(4,5)P2 par les PI(4)P 5-kinases constitue la principale voie de production du PI(4,5)P2. De manière intéressante, certaines PI(4)P 5-kinases sont enrichies à l'équateur en anaphase, mais leur contribution dans la synthèse du PI(4,5)P2 en mitose n'a pas été caractérisée. De plus, la GTPase Rab35 pourrait participer à l'enrichissement du PI(4,5)P2 à la membrane du pont intercellulaire, en permettant le transport microtubules-dépendant de vésicules de recyclage recouvertes de PI(4)P 5-kinase [162] (*figure 35*). Ces PI(4)P 5-kinases, inactives lorsque localisées sur ces endomembranes, seraient transférées à la membrane plasmique du pont intercellulaire où elles seraient activées, participant ainsi à une production localisée du PI(4,5)P2 (*figure 35*).

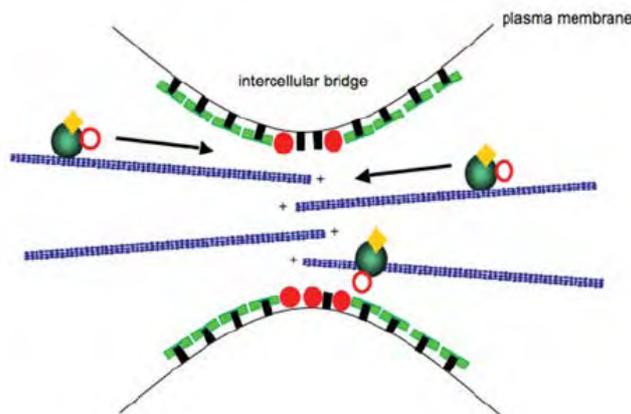


Figure 35 : modèle de régulation du PI(4,5)P2 par des endosomes de recyclage.

Le transport orienté sur les microtubules (rectangles bleus) de vésicules de recyclage (sphères vertes), régulé par la GTPase Rab35 (losanges orange) permettrait de localiser les PI(4)P-5 kinases inactives (cercles rouges) à proximité du pont intercellulaire. Ces PI(4)P-5 kinases seraient ensuite activées (sphères rouges) et recrutées à la membrane du pont intercellulaire où elles participeraient à la production du PI(4,5)P2 (rectangles verts).
D'après Echard, 2008

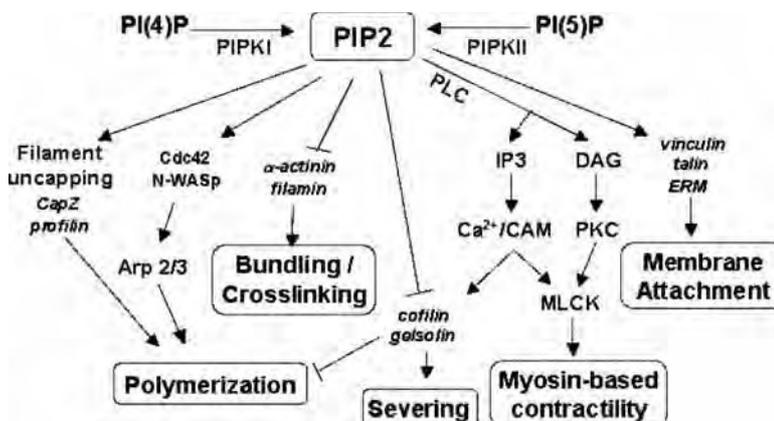
53. Le PI(4,5)P2 contribue à la dynamique de l'anneau contractile.

Le PI(4,5)P2 constitue le phosphoinositide majeur de la membrane plasmique. De nombreuses études soulignent le rôle critique du PI(4,5)P2 dans la stabilité du sillon de clivage et la cytokinèse [159], [161]. La séquestration du PI(4,5)P2 par un domaine protéique spécifique de ce phospholipide, ou le traitement par un inhibiteur des PLC tel que le lithium ou le U73122, entraînent une régression du sillon de clivage suggérant que le PI(4,5)P2 et son hydrolyse sont nécessaires à la dynamique de l'anneau d'Actomyosine [163], [161]. Des protéines contrôlant la dynamique de l'Actine et nécessaires à l'ingression du sillon de clivage, telles que la Profiline, Diaphanous ou encore la Cofiline [9], [164], [165], présentent un changement d'activité et/ou de localisation suite à la liaison au PI(4,5)P2. Le PI(4,5)P2 est de plus capable (i) d'activer les protéines WASp et le complexe protéique ARP2/3 (figure 34), et (ii) de décaper les filaments d'Actine permettant l'ajout de nouveaux monomères d'Actine [166], [167] (cf. 212) (figure 34).

Figure 34 : régulation du cytosquelette d'actine par le PI(4,5)P2.

Les flèches noires symbolisent des stimulations (directes ou indirectes) et les lignes suivies d'une barre des inhibitions.

D'après Logan & Mandato, 2006.



Des études réalisées chez la levure montrent que le PI(4,5)P2 contribue également à enrichir Rho aux sites de division [168]. En plus de réguler directement la dynamique de

l'Actine, le PI(4,5)P2 la régule aussi indirectement via la production de diacylglycérol (DAG) et d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) suite à son hydrolyse par les phospholipases C (*figure 34*). En se fixant sur les récepteurs calciques du réticulum endoplasmique, l'IP3 provoque la libération d'ions calcium favorisant l'activation de la Gelsoline [169] et de la Cofiline [170] par la Calmoduline (*figure 34*), conduisant au clivage et à la dépolymérisation des filaments d'Actine (cf. 212). L'activation de la Calmoduline conduit aussi à celle de la MLCK (Mysin regulatory Light Chain Kinase), qui active par phosphorylation la MLC [171] (*figure 34*) (cf. 213). Le PI(4,5)P2 est donc nécessaire à la stabilité et à l'ingression du sillon de clivage, grâce à sa capacité à moduler la dynamique de l'anneau d'Actomyosine à l'équateur.

En conclusion, le PI(4,5)P2 est connu pour jouer un rôle à l'équateur de la cellule en mitose en promouvant la contraction de l'anneau d'actomyosine. Il est cependant possible que ce phospholipide remplisse des fonctions additionnelles au cours de la division cellulaire, qui restent à identifier et caractériser. Les mécanismes qui régulent la synthèse et la distribution du PI(4,5)P2 durant la division cellulaire restent eux aussi à explorer.

Objectifs et stratégies expérimentales des travaux

L'ensemble des données disponibles au démarrage de ce travail suggérait une interaction fonctionnelle entre d'une part la régulation de la composition locale de la membrane plasmique par le PI(4,5)P2, et d'autre part la régulation de son lien avec les microfilaments d'Actine sous-jacents par les protéines ERMs, pour la réorganisation du cortex cellulaire.

Rappelons en effet que le PI(4,5)P2 favorise l'activation des ERMs, au moins *in vitro*. De plus, la dMoésine et le PI(4,5)P2 sont tous deux nécessaires au déroulement de la division cellulaire, même si leurs rôles respectifs ne sont pas pleinement caractérisés. Enfin, la relative simplicité du génome de la drosophile peut faciliter les approches fonctionnelles, notamment dans le cas des protéines ERMs. **La question principale à laquelle je me suis attachée a donc été de mieux comprendre le rôle du PI(4,5)P2 à travers les différentes étapes de la mitose, et de tester son éventuelle implication dans la régulation de l'activité de la dMoésine.**

La stratégie générale a été de privilégier la qualité des observations, et notamment l'utilisation systématique d'imagerie du vivant, pour accéder à la dynamique temporelle de la localisation subcellulaire des différents acteurs analysés. Les cellules de drosophile sont bien adaptées à la réalisation de cribles fonctionnels, faciles à manipuler et notamment sensibles à l'interférence ARN pour inhiber l'expression de gènes par traitement dsRNA. L'autre dimension a donc été la recherche d'une certaine exhaustivité, en analysant l'influence de l'ensemble des régulateurs présumés de la biosynthèse du PI(4,5)P2 et des phosphatases PP1 et PP2 de la drosophile.

Une première étude à laquelle j'ai contribué a voulu définir, *in vivo*, les contributions relatives de la fixation au PI(4,5)P2 et de la phosphorylation sur l'activité de la dMoésine. La stratégie retenue a été de substituer à la protéine endogène des formes mutées, pour prévenir la fixation au PI(4,5)P2, la phosphorylation, ou au contraire mimer cette phosphorylation, séparément et en combinaison. Pour ma part, je me suis attachée à analyser l'effet de ces différentes mutations sur la distribution subcellulaire de la dMoésine dans des cellules en culture, en interphase. Le résultat majeur de ces études étant la prévalence de la capacité de fixation au PI(4,5)P2, autant pour la fonction *in vivo* que pour la localisation cellulaire de la dMoésine, il m'a encouragé pour analyser en détail cette interaction au cours de la mitose.

Mon approche a été ensuite de générer un ensemble de lignées cellulaires, exprimant de manière stable différentes protéines en fusion avec une moitié fluorescente, pour analyser, sur cellules vivantes, la dynamique de leur distribution dans des conditions contrôles ou suite à la déplétion d'un gène donné. Doté de cette batterie d'outils, couplée au développement d'approches d'imagerie adaptées, j'ai ensuite analysé de manière systématique l'influence de la déplétion d'une cinquantaine d'enzymes sur le déroulement général et la dynamique de la mitose.

La deuxième étude s'est attachée à mieux définir le rôle de la dMoésine, et de son activation localisée aux différentes étapes du cycle cellulaire. Des résultats préliminaires montraient l'existence d'activité(s) phosphatase(s) contrecarrant l'activation (par phosphorylation) de la Moésine, que j'ai voulu identifier et caractériser. D'autre part, j'ai développé des outils originaux et/ou complémentaires pour bien définir le rôle du PI(4,5)P2 en mitose et son influence sur l'activité et la distribution de la dMoésine au cortex mitotique. Mes résultats positifs m'ont conduit à analyser le rôle éventuel de l'ensemble des enzymes susceptibles de participer à l'homéostasie du PI(4,5)P2 au cours de la mitose, en me focalisant d'abord sur l'organisation du cortex cellulaire. Ensemble, mes travaux produisent une vision « intégrée » du contrôle de la production du PI(4,5)P2 dans les cellules de drosophile en division et leur influence, en dialogue avec le contrôle de la (dé)phosphorylation de la dMoésine, sur l'organisation du cortex mitotique.

Ma contribution à la **troisième étude** a été d'utiliser les mêmes approches, crible fonctionnel exhaustif basé sur l'imagerie du vivant, pour rechercher parmi les enzymes du métabolisme des phosphoinositides ceux dont la déplétion empêche la division cellulaire. Ce travail a permis d'identifier un « nouveau » régulateur de la distribution du PI(4,5)P2 sur les membranes intracellulaires *versus* membrane plasmique, et de montrer son rôle clé dans la mise en place et la fonctionnalité du sillon de clivage.

RESULTATS

I.

**En participant à la régulation de la dMoésine, le
PI(4,5)P2 contribue à l'homéostasie tissulaire au
cours du développement**

RESUME

Chez les mammifères, l'analyse fonctionnelle des protéines de la famille ERM est difficile en raison de leur partielle redondance et de leur co-expression dans de nombreux tissus. A l'inverse, le génome de la drosophile présente un seul gène codant une protéine de la famille ERM, la dMoésine, faisant de celle-ci un modèle de choix pour mieux comprendre leur régulation ou leur fonction *in vivo*.

Alors que l'activation des protéines ERMs est supposée être dépendante d'une liaison au PI(4,5)P2 et d'une phosphorylation sur la thréonine 559, cette étude met en évidence un rôle différentiel de ces deux mécanismes de régulation dans la fonctionnalité de la dMoésine en fonction du tissu analysé. En effet, par une approche de génétique, ces travaux montrent que si la liaison de la dMoésine au PI(4,5)P2 et sa phosphorylation sur la thréonine 559 sont toutes les deux nécessaires à la morphogénèse de l'œil, seule la liaison de la dMoésine au PI(4,5)P2 est nécessaire à l'intégrité de l'épithélium de l'aile. Cette liaison au PI(4,5)P2 participe à la localisation de la dMoésine au sein du tissu épithélial de l'aile, puisqu'une forme mutante incapable de lier le PI(4,5)P2 n'est plus apte à se localiser au cortex apical de ces cellules. Par ailleurs, une production ectopique de PI(4,5)P2 par la surexpression de la PI4P-5 kinase Skittles a pour conséquence un recrutement excessif de la dMoésine au cortex enrichi en PI(4,5)P2.

D'autre part, cette étude met également en évidence que l'activation constitutive de la dMoésine n'est pas compatible avec la restauration de la viabilité de l'organisme. En effet, alors que la létalité induite par l'inhibition de la dMoésine endogène peut être sauvée par l'expression d'une forme sauvage ou non phosphorylable de la dMoésine, elle ne peut l'être par l'expression d'une forme phosphomimétique.

L'activation de la dMoésine doit donc être finement contrôlée au cours du développement, afin de permettre la viabilité des organismes et simultanément la morphogénèse tissulaire et cellulaire.

Ma participation à cette étude a consisté à évaluer le rôle du PI(4,5)P2 et de la phosphorylation dans la localisation de la dMoésine dans les cellules S2, qui a constitué un point d'entrée pour une étude plus approfondie de ces mécanismes de régulation dans le cadre de la division cellulaire.

Differential roles of PtdIns(4,5) P_2 and phosphorylation in moesin activation during *Drosophila* development

Fernando Roch^{1,2,*}, Cédric Polesello^{1,2}, Chantal Roubinet^{1,3,2}, Marianne Martin⁴, Christian Roy⁴, Philippe Valenti^{1,2}, Sébastien Carreno³, Paul Mangeat^{4,5} and François Payre^{1,2,*}

¹Université de Toulouse UPS, Centre de Biologie du Développement, Bâtiment 4R3, 118 route de Narbonne, Toulouse, 31062, France

²CNRS, UMR5547, Centre de Biologie du Développement, Toulouse, F-31062, France

³Institute for Research in Immunology and Cancer, Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, 2900 Édouard-Montpetit Boulevard, Marcelle-Coutu Pavilion Quai 20, Montreal, QC H3T 1J4, Canada

⁴Université de Montpellier II and CNRS, Laboratoire de Dynamique Moléculaire des Interactions Membranaires, Place E. Bataillon, Montpellier, 34095 Cedex 05, France

⁵Université de Montpellier II and CNRS, CRBM, 1919 Route de Mende, Montpellier, 34293 Cedex 05, France

*Authors for correspondence (roch@cict.fr; payre@cict.fr)

Accepted 25 March 2010

Journal of Cell Science 123, 2058–2067

© 2010. Published by The Company of Biologists Ltd

doi:10.1242/jcs.064550

Summary

The ezrin, radixin and moesin (ERM) proteins regulate cell membrane architecture in several cellular contexts. Current models propose that ERM activation requires a PtdIns(4,5) P_2 -induced conformational change, followed by phosphorylation of a conserved threonine. However, how these inputs contribute in vivo to orchestrate ERM activation is poorly understood. We addressed this issue by evaluating the contribution of PtdIns(4,5) P_2 and phosphorylation to the regulation of moesin during *Drosophila* development. Unexpectedly, we found that a form of moesin that cannot be phosphorylated displayed significant activity and could substitute for the endogenous product during wing morphogenesis. By contrast, we also show that PtdIns(4,5) P_2 binding is essential for moesin recruitment to the membrane and for its subsequent phosphorylation. Our data indicate that PtdIns(4,5) P_2 acts as a dosing mechanism that locally regulates ERM membrane recruitment and activation, whereas cycles of phosphorylation and dephosphorylation further control their activity once they have reached the cell cortex.

Key words: ERM proteins, Actin cytoskeleton, PtdIns(4,5) P_2 , Moesin, *Drosophila* morphogenesis

Introduction

In eukaryotic cells, the organisation and dynamic properties of the plasma membrane depend on a finely regulated interplay between the lipid bilayer and the subjacent cortical actin cytoskeleton, which work together as a single functional unit. Proteins of the ezrin, radixin and moesin (ERM) family act as dynamic linkers between the actin cytoskeleton and the plasma membrane and hence are implicated in the regulation of membrane organisation in numerous cellular and developmental processes (Bretscher et al., 2002; Polesello and Payre, 2004). ERM proteins cycle between an active form, which interacts with both membrane proteins and actin filaments, and a dormant form that localises in the cytoplasm. The dormant conformation is stabilised by an intramolecular interaction that occurs between the N-terminal region (FERM domain) and the C-terminal tail, which contains the F-actin-binding domain (Gary and Bretscher, 1995; Turunen et al., 1994). Adoption of an open, active conformation requires disruption of this interaction in ERM proteins, which unmasks the F-actin-binding region and frees the FERM domain for interaction with its membrane partners.

Two regulatory mechanisms are known to participate in ERM protein activation. First, structural data show that phosphorylation of a conserved threonine residue in the C-terminal domain hinders the intramolecular interaction between FERM and the C-terminus, favouring the open conformation (Matsui et al., 1998; Pearson et al., 2000). Accordingly, many studies suggest that phosphorylation is a key factor controlling ERM activity in vivo (Carreno et al., 2008; Chorna-Ornan et al., 2005; Hayashi et al., 1999; Hipfner et al., 2004; Polesello et al., 2002). Second, evidence obtained from

biochemical and cellular assays shows that ERM proteins directly bind to phosphatidylinositol-(4,5)bisphosphate [PtdIns(4,5) P_2], which also promotes their activation (Barret et al., 2000; Nakamura et al., 1999; Niggli et al., 1995; Yonemura et al., 2002). Indeed, studies focusing on the mammalian ezrin have shown that PtdIns(4,5) P_2 binding is a prerequisite for its subsequent phosphorylation (Fievet et al., 2004). Thus, PtdIns(4,5) P_2 is generally envisaged as a membrane cofactor, with specific kinases or phosphatases being the chief players controlling the dynamic aspects of ERM protein regulation. However, recent reports in some cellular contexts show that drastic fluctuations of PtdIns(4,5) P_2 levels have a rapid impact on ERM activation, indicating that the level of PtdIns(4,5) P_2 could have an instructive role on ERM protein activity (Hao et al., 2009; Rasmussen et al., 2008).

To bring new insight into the in vivo mechanisms activating ERM proteins, we evaluated the respective contributions of PtdIns(4,5) P_2 and phosphorylation to the dynamic regulation of ERM proteins during morphogenesis. For this, we developed a genetic approach, focusing on the influence of these two regulatory inputs on the activity of the sole *Drosophila* ERM representative, the moesin protein (Moe) (McCartney and Fehon, 1996; Polesello et al., 2002). We assessed the localisation and biological activity of engineered Moe variants specifically perturbing these two regulatory events, showing that PtdIns(4,5) P_2 binding targets the Moe protein to specific membrane domains in a phosphorylation-independent process. In fact, as long as it interacts with PtdIns(4,5) P_2 , a Moe form that cannot be phosphorylated at T559 displays a substantial degree of activity, which varies depending on the cellular context examined.

In addition, PtdIns(4,5) P_2 -dependent membrane recruitment of Moe appears both a prerequisite and the rate-limiting step for its subsequent phosphorylation. By contrast, expression of a Moe phosphomimetic form provokes profound deleterious effects on development, which are only partially suppressed when PtdIns(4,5) P_2 interaction is prevented. Altogether, our data indicate that phosphoinositide levels have an intrinsic role during ERM activation in vivo, with dynamic phosphorylation further contributing to the fine-tuning of ERM activity in specific morphogenetic contexts.

Results

Binding to PtdIns(4,5) P_2 is required for Moe membrane localisation in *Drosophila*

Biochemical studies have shown that human ezrin binds to PtdIns(4,5) P_2 (Barret et al., 2000; Niggli et al., 1995). To determine whether this feature also applies to Moe, we analysed its ability to cosediment with liposomes containing increasing concentrations of PtdIns(4,5) P_2 under conditions of physiological ionic strength (Niggli et al., 1995). We observed a clear positive correlation between the amount of PtdIns(4,5) P_2 present in the liposomes and the proportion of Moe associated with these vesicles (Fig. 1A). Conversely, Moe did not associate with liposomes containing only

phosphatidylcholine or supplemented with either phosphatidylserine or phosphatidylethanolamine, indicating that Moe interacts with PtdIns(4,5) P_2 and not with other common membrane phospholipids (Fig. 1B). Similarly to ezrin (Barret et al., 2000), substitution in the Moe protein of two conserved lysine doublets (K254-K255 and K263-K264) by asparagines (MoeKN form) abolished binding to PtdIns(4,5) P_2 (Fig. 1C), whereas its weak affinity for other phospholipids was not altered (Fig. 1A,B). Thus, although we cannot rule out an interaction of Moe with other phosphoinositides, these results indicate that this ERM protein, like ezrin, binds to PtdIns(4,5) P_2 .

To evaluate the influence of PtdIns(4,5) P_2 binding on the subcellular distribution of Moe, we expressed different mutant GFP-tagged versions of these proteins in *Drosophila* S2 cells. The MoeWT-GFP protein was seen in the cytoplasm and also associated with F-actin-rich structures in the cell cortex (Fig. 2A). By contrast, MoeKN-GFP did not accumulate in the membrane and localised preferentially in the cytoplasm (Fig. 2B,G). Although significant amounts of a Moe form that cannot be phosphorylated (MoeTA-GFP, carrying the T559A mutation) were still seen associated with the cortex (Fig. 2C,G), the double mutant MoeKNTA-GFP behaved in a similar manner to MoeKN-

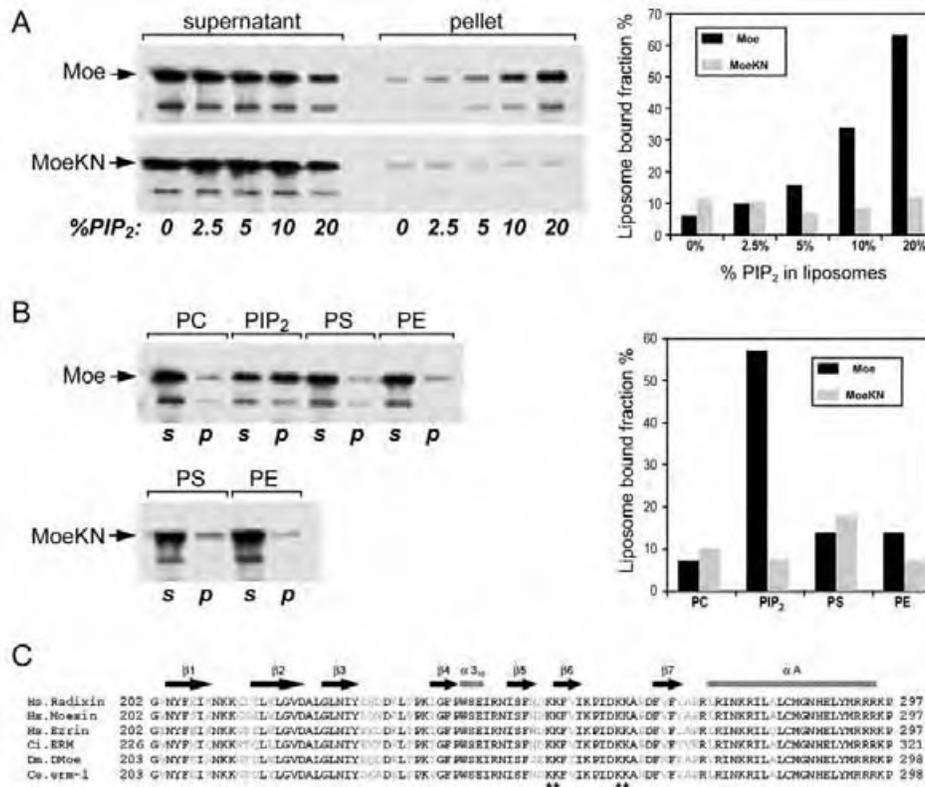


Fig. 1. *Drosophila* Moe binds to PtdIns(4,5) P_2 in a liposome co-sedimentation assay. (A) MoeWT and MoeKN association with phosphatidylcholine liposomes containing increasing concentrations of PtdIns(4,5) P_2 . The supernatant contains the free Moe fraction, whereas the pellet contains the lipid-associated Moe. Full-length Moe (upper panel, arrow) but not full-length MoeKN (lower panel, arrow) binds to PtdIns(4,5) P_2 -containing liposomes. The graph shows the percentage of Moe protein recovered in each fraction. (B) Full-length wild-type Moe (upper panel, arrow) and full-length MoeKN (lower panel, arrow) found in the supernatant (s) or pellet (p) fractions, after incubation with liposomes containing either 100% phosphatidylcholine (PC) or supplemented with 20% PtdIns(4,5) P_2 (PIP₂), 20% phosphatidylserine (PS) or 20% phosphatidylethanolamine (PE). The graph illustrates the percentage of Moe protein found associated with liposomes in each condition. Wild-type Moe associates with liposomes in the presence of PtdIns(4,5) P_2 , but not other phospholipids, whereas MoeKN is never found associated with liposomes. (C) Sequence alignment corresponding to the F3 FERM subdomain of six different ERM proteins (human: NP_002879, NP_002435 and NP_003370; *Ciona*: NP_001027599; *Drosophila*: P46150; and *Caenorhabditis*: NP_491559). Invariant amino acids are highlighted in black. The two Lys doublets substituted by Asn are indicated with asterisks. Above the alignment is shown the secondary structure of the F3 subdomain (β -strand, black arrow; α -helix, grey box). The Lys doublets are in the cytosol-exposed loops of the FERM domain (Pearson et al., 2000).

GFP and was cytoplasmic (Fig. 2D,G). As previously observed (Kunda et al., 2008), the phosphomimetic form MoeTD-GFP (T559D) appeared enriched in the cortex and its expression induced formation of ectopic F-actin structures at the membrane (Fig. 2E,G). In addition, MoeTD-GFP elicited clear morphological defects: cells appeared contracted and rounded (Fig. 2E,H). However, when combined with KN mutations, the phosphomimetic version MoeKNTD-GFP localised at the cortical level, similarly to MoeWT-GFP (Fig. 2F,G). Therefore, the presence of the phosphomimetic mutation promotes Moe access to the cell cortex, even when PtdIns(4,5) P_2 binding is impaired. However, MoeKNTD-GFP expression did not induce morphological alterations, unlike MoeTD-GFP (Fig. 2F,H).

Regulation of Moe activity by PtdIns(4,5) P_2 is crucial for fly morphogenesis

To test the activity of these different Moe variants in vivo, we monitored their ability to substitute for the endogenous product during fly development. We generated transgenic lines expressing Moe mutant forms under the control of an UAS promoter (Brand and Perrimon, 1993) and selected those that, upon induction with the ubiquitous *tubulin-GAL4^{LL7}* driver, produced Moe levels comparable with those seen for the endogenous protein (supplementary material Fig. S1A). We then analysed whether the different Moe versions could rescue the phenotypes associated with the two loss of function alleles *Moe^{PL106}* and *Moe^{PL54}*, both caused by P-element insertions in different *Moe* regulatory regions (Polesello et al., 2002). The *Moe^{PL106}* mutant allele leads to lethality during late development, but we observed *Moe^{PL106}* adult escapers appearing at low frequency in our fly cultures. Wings of these escapers were often crumpled and

reduced in size and their eyes displayed a rough-eye phenotype, because ommatidia were reduced in number and appeared disorganised (Fig. 3A). We also tested the rescuing properties of Moe variants using *Moe^{PL54}*, the strongest available *Moe* allele, which leads to 100% lethality in embryonic or early larval stages.

Expression of MoeWT-GFP greatly enhanced the viability and restored the visible phenotypes of both *Moe^{PL106}* and *Moe^{PL54}* mutants (Fig. 3A,B). However, MoeKNTA-GFP showed little rescuing activity, confirming that PtdIns(4,5) P_2 binding and T559 phosphorylation are the major events controlling Moe activation in vivo. In contrast to previous reports (Hipfner et al., 2004; Speck et al., 2003), we found that expression of MoeTD-GFP did not rescue the mutant phenotypes and instead provoked lethality in both *Moe* mutants and wild-type siblings. Thus, MoeTD-GFP interferes with normal development, mirroring the deleterious effects observed in S2 cells. Unexpectedly, we also observed that all lines expressing MoeTA-GFP significantly enhanced the viability of *Moe^{PL106}* flies. In addition, the wings of these rescued animals showed wild-type morphology, indicating that MoeTA-GFP retains some activity (Fig. 3A). However, *Moe^{PL106}* mutants rescued by MoeTA-GFP still exhibited obvious eye phenotypes, confirming that Moe phosphorylation is essential for proper morphogenesis in this tissue (Fig. 3A). By contrast, MoeKN-GFP, which cannot bind to PtdIns(4,5) P_2 , retained only a weak activity, because it slightly enhanced *Moe^{PL106}* viability. In addition, these escapers had rough eyes and crumpled wings, suggesting that Moe PtdIns(4,5) P_2 -binding activity is necessary for the morphogenesis of these tissues (Fig. 3A,B). Finally, we observed that the toxic effects induced by expression of MoeTD-GFP were suppressed if its interaction with PtdIns(4,5) P_2 was prevented. Indeed, expression of MoeKNTD-

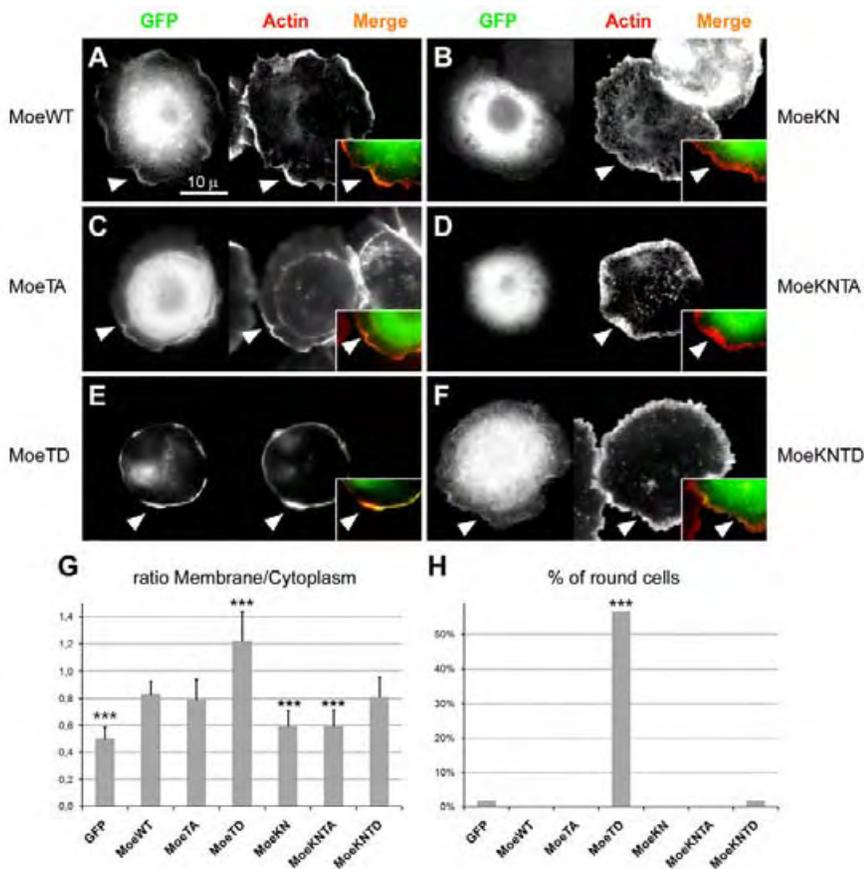


Fig. 2. PtdIns(4,5) P_2 binding is required for Moe localisation in *Drosophila* S2 cells. S2 cells transfected to express the different Moe-GFP mutant versions (right panels, green in merge insets) were stained with Rhodamine-phalloidin to reveal F-actin (left panels, red in merge insets). (A) In addition to a cytoplasmic distribution, MoeWT-GFP colocalises with F-actin at the cell cortex (arrowheads). Scale bar: 10 μ m. (B) MoeKN-GFP does not associate with the cortex and remains in the cytoplasm. (C) MoeTA-GFP shows colocalisation with F-actin at the cell periphery (arrowheads). (D) The MoeKNTA-GFP double mutant localises exclusively in the cytoplasm. (E) Cells expressing MoeTD-GFP have an abnormal contracted morphology, displaying a characteristic round shape. We detected increased levels of MoeTD-GFP at the cell cortex, compared with MoeWT-GFP (arrowheads). (F) MoeKNTD-GFP does not induce morphological alterations and is found both in the cytoplasm and at the F-actin cortex (arrowheads). (G) Graph presenting the membrane/cytoplasm signal ratios observed in cells expressing the different Moe-GFP versions. Free GFP is shown as control. Error bars indicate s.d. ($n=20$ for each construct). Distributions significantly different from that of MoeWT-GFP are labelled with asterisks ($***P<10^{-4}$ in Student's *t*-tests). (H) Proportion of cells displaying a rounded morphology, estimated as the percentage of cells presenting a circularity index [$\pi \times \text{area} / \text{sq}(\text{perimeter})$] >0.98 . A value of 1.0 indicates a perfect circle ($n=60$ for each construct).

GFP also enhanced the viability of *Moe*^{PL106} flies and restored the wing phenotypes (Fig. 3A,B). However, MoeKNTD-GFP did not rescue the eye phenotype, and elicited even stronger eye defects in *Moe*^{PL106} adults (Fig. 3A).

Since our rescuing assays used GFP-tagged proteins, it remained possible that the GFP moiety could influence their activity. We therefore produced transgenic lines driving robust expression of a set of equivalent full-length untagged *Moe* variants (supplementary material Fig. S1B). *Moe* mutant flies rescued after expression of these untagged versions showed phenotypes identical to those observed after expression of the corresponding tagged forms (not shown). However, untagged forms better enhanced the viability of the *Moe* mutants, suggesting that addition of a GFP moiety is slightly detrimental for Moe activity. Indeed, expression of untagged MoeTA and MoeKNTD now also rescued the lethality of the strong *Moe*^{PL54} allele (Fig. 3B and supplementary material Fig. S2), further indicating that these two forms have significant biological activity. We did not observe dominant phenotypes in wild-type flies after expression with *tubulin-GAL4* of the different *Moe* variants, except in two cases: MoeTD, which caused lethality in early larva and MoeKNTD, whose expression did not affect viability, but elicited a mild rough-eye phenotype.

In summary, our results indicate that in vivo regulation of Moe does not rely exclusively on control of its phosphorylation state. In fact, the form that cannot be phosphorylated (MoeTA) is the variant that displays the highest activity and is able to rescue the strong *Moe*^{PL54} mutant. By contrast, inhibition of binding to phospholipids has a deeper impact on Moe activity, which can nevertheless be compensated to a limited extent by a concomitant phosphomimetic mutation.

PtdIns(4,5)P₂ binding, but not phosphorylation, is essential for Moe function in wing cells

Our data indicate that Moe regulation by T559 phosphorylation is essential for eye morphogenesis but could have a less-prominent role during wing development. This unexpected result prompted us to characterise at the cellular level how Moe activity is regulated in the developing wing disc, where Moe has been shown to be required for epithelial integrity (Hipfner et al., 2004; Speck et al., 2003). Consistently, we observed wing cells detached from the main epithelium in *Moe*^{PL106} adult escapers (Fig. 3A). To study this phenotype in a reproducible system, we generated mosaic wing discs containing clones of homozygous *Moe* mutant cells (Fig. 4A-F). All observed *Moe*^{PL106} mutant clones contained extruding cells in the most basal part of the epithelium (Fig. 4A,D). Most of these cells had pyknotic nuclei (Fig. 4A,D) and expressed high levels of activated Caspase3 (Fig. 4E,F), indicating that they undergo apoptosis. We tested the ability of the different *Moe* variants to rescue this phenotype when driven exclusively in the *Moe*^{PL106} mutant cells. Expression of either MoeWT-GFP or MoeTA-GFP prevented the formation of extruding cells in all observed clones, confirming that regulation of Moe by phosphorylation is dispensable for epithelium integrity (Fig. 4G,I). Conversely, we observed apoptotic extruding cells with all the other *Moe* variants, including MoeKNTD-GFP (Fig. 4H,J-L), which indicates that this form is also unable to provide full rescue activity in the wing cells; a fact that went unnoticed in our escaper analysis probably because of the regulative properties of the wing disc. In fact, the development of this appendage can compensate for substantial amounts of cell death without showing obvious defects.

Analysis of the distribution of these *Moe* variants in wing cells was also informative. MoeWT-GFP accumulated in F-actin-rich

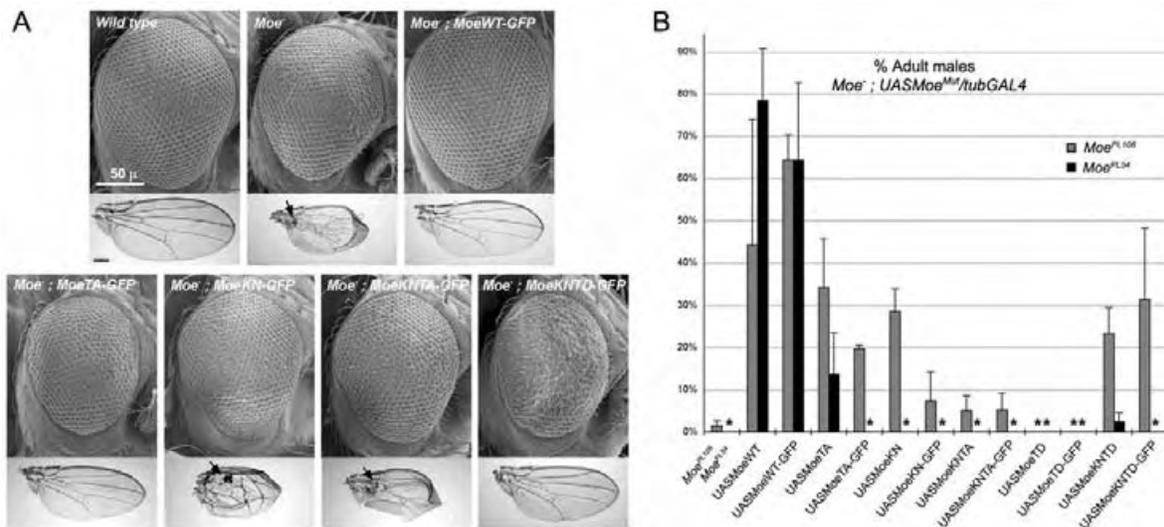


Fig. 3. Testing the biological activity of Moe mutants affecting its phosphorylation and its PtdIns(4,5)P₂ binding ability. (A) Scanning electron micrographs of adult eyes and pictures of wings taken from different rescued *Moe*^{PL106} males. *Moe*^{PL106} escapers present reduced rough eyes and small crumpled wings displaying cuticle vesicles trapped between the two wing surfaces (black arrows). Expression of MoeWT-GFP completely rescues both wing and eye phenotypes. However, none of the different *Moe* variants (MoeTA-GFP, MoeKN-GFP, MoeKNTA-GFP and MoeKNTD-GFP) is able to rescue the eye defects. MoeKNTD-GFP-expressing flies show eyes further reduced and more disorganised than the *Moe*^{PL106} mutants. MoeKN-GFP and MoeKNTA-GFP do not rescue the wing phenotypes, whereas all wings expressing MoeTA-GFP and MoeKNTD-GFP are normal. Scale bars: 50 μ m top panels, 250 μ m, bottom. (B) The histogram represents the percentage of *Moe*^{PL106} (grey bars) or *Moe*^{PL54} (black bars) mutant flies reaching the adult stage after rescue with the different *Moe* versions (males *Moe*⁻; *tubulin-GAL4*/UAS*Moe*^{Mut}). Each bar of the histogram corresponds to an average rescue obtained pooling together all the different transgenic lines that code for the same *Moe* version (see supplementary material Fig. S2). The bars labelled *Moe*^{PL106} and *Moe*^{PL54} correspond to the proportion of *Moe*⁻; *tubulin-GAL4*/+ escapers obtained in control experiments. Asterisks indicate lethal combinations. Error bars correspond to the s.d.

cortical structures and reached its highest levels in the apical-most part of the cell (Fig. 5A). We also detected a weaker and more diffuse signal in the cytoplasm and nucleus (Fig. 4G). The subcellular distribution of MoeTA-GFP was similar, but accumulation in the most apical part of the cells was less prominent (Fig. 5B). By contrast, MoeKN-GFP and MoeKNTA-GFP did not concentrate in F-actin-rich regions and showed diffuse staining, presenting a graded distribution with higher levels in the apical portion of the epithelium (Fig. 4H,J and Fig. 5D,E). MoeTD-GFP was never seen in the cytoplasm and was exclusively found in association with the cell cortex, reaching abnormally high levels in the lateral membrane and triggering ectopic accumulation of F-actin in these regions (Fig. 4K and Fig. 5C). Finally, the MoeKNTD-GFP distribution was more similar to that of MoeWT-GFP and differs from MoeTD-GFP in several aspects: it was readily detected in the cytoplasm, it accumulated preferentially in apical regions and its expression did not affect the organisation of the actin cytoskeleton (Fig. 4L and Fig. 5F).

We have shown that MoeKNTD has some biological activity, because it could improve the viability of *Moe* mutant flies. But can an active phosphorylated form such as MoeKNTD occur in vivo if PtdIns(4,5) P_2 -binding is prevented? We tested this possibility using a specific antibody against phosphorylated T559 (Moe-P) (Karagiannis and Ready, 2004). As expected, Moe-P levels were clearly diminished in *Moe*^{PL106} mutant clones (Fig. 6A), whereas the Moe-P signal was recovered upon reintroduction of MoeWT-GFP in the mutant cells (Fig. 6B). However, no Moe-P signal was detected in mutant cells expressing the MoeKN-GFP form (Fig. 6C), a result confirmed in

immunoblots of protein extracts obtained from *Moe*^{PL106} adult flies expressing either MoeKN-GFP or MoeKN (Fig. 6D).

Thus, our results indicate that PtdIns(4,5) P_2 binding has an essential role in the wing epithelium: it is a prerequisite for Moe phosphorylation and is essential to localise Moe to the cell cortex. By contrast, T559 phosphorylation appears to be dispensable in this tissue both for cortical accumulation of Moe and Moe activity.

The distribution of PtdIns(4,5) P_2 affects Moe localisation in the wing epithelium

PtdIns(4,5) P_2 binding seems to be required for in vivo regulation of Moe activity. One possibility is that PtdIns(4,5) P_2 could regulate the subcellular localisation of Moe. To test this hypothesis, we visualised the distribution of PtdIns(4,5) P_2 in wing cells by studying the localisation of a phospholipase C (PLC) $\delta 1$ pleckstrin-homology domain coupled to GFP (PH-GFP), a protein probe that binds specifically to PtdIns(4,5) P_2 (Stauffer et al., 1998; Zelfhof and Hardy, 2004). In wild-type wing cells, PH-GFP was seen associated with the cortex throughout the cells, accumulating at high levels in the apical domain (Fig. 7A). This distribution was similar to that observed for MoeTA-GFP (Fig. 7E), which is consistent with the idea that in the absence of T559 phosphorylation, PtdIns(4,5) P_2 controls the subcellular localisation of Moe.

To further evaluate this possibility, we increased the cellular levels of PtdIns(4,5) P_2 and monitored the consequences on Moe localisation. Type I phosphatidylinositol kinases (PIP5Ks) have a prominent role in the synthesis of PtdIns(4,5) P_2 from the PtdIns(4) P precursor (Yin and Janmey, 2003). In *Drosophila*, the *skittles* (*skt*) locus codes for a PIP5KI (Hassan et al., 1998). Upon ectopic

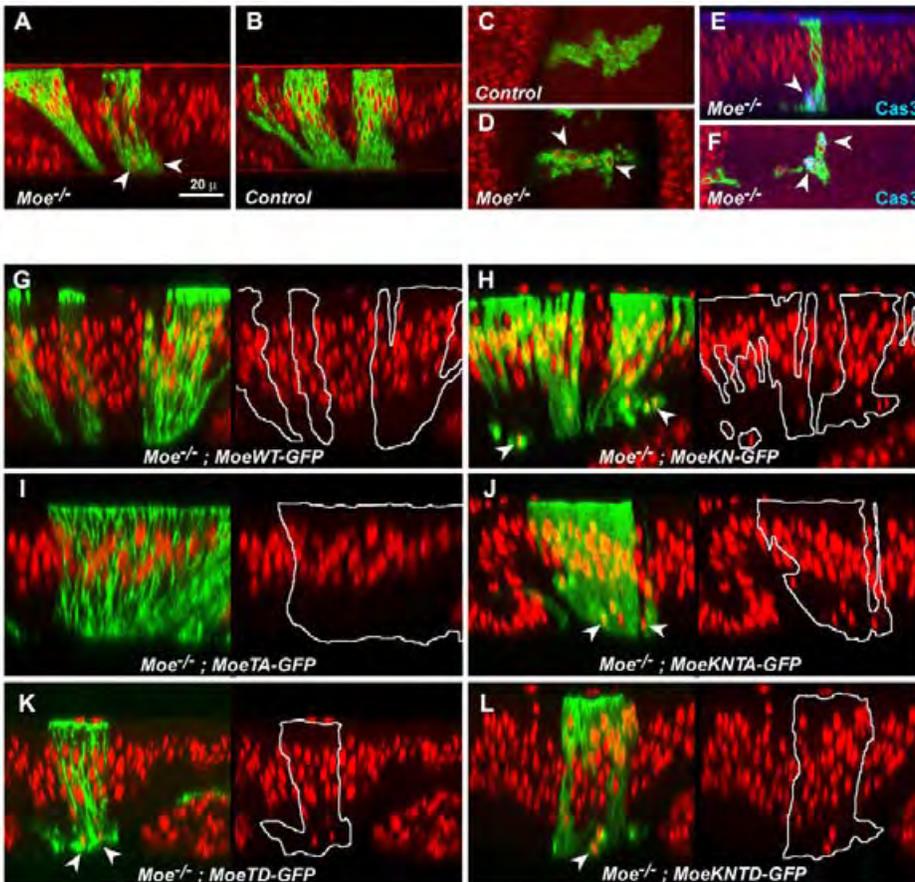


Fig. 4. Functional analysis of Moe regulation in the wing-disc epithelium. All pictures are confocal longitudinal sections of third larval instar wing epithelia (apical is up, basal is down) except panels C, D and F, which correspond to transverse optical sections showing the basal part of the disc. Nuclei are labelled with Topro3 (red), whereas E and F are also stained with an activated Caspase3-specific antibody (blue). All images were taken at the same magnification. Scale bar: 20 μ m. (A-F) Control or *Moe*^{-/-} mutant cells are labelled positively with mCD8GFP (green). Pyknotic nuclei corresponding to extruded *Moe*^{-/-} mutant cells (arrowheads) are found in the basal part of the imaginal disc (compare A,D with controls in B,C). (E-F) Extruded cells are apoptotic and express activated Caspase3 (arrowheads). (G-L) Wing discs containing *Moe* mutant clones expressing autonomously the different MoeGFP-tagged versions (GFP distribution is shown in green). The adjacent right panels show the nuclei distribution, with clone position marked by a white contour. Expression of MoeWT-GFP (G) but also of MoeTA-GFP (I) rescues the *Moe*^{-/-} cell extrusion phenotype, whereas apoptotic cells (arrowheads) are still found in clones expressing MoeTD-GFP (K) or any of the forms not binding to PtdIns(4,5) P_2 : MoeKN-GFP (H), MoeKNTA-GFP (J) and MoeKNTD-GFP (L).

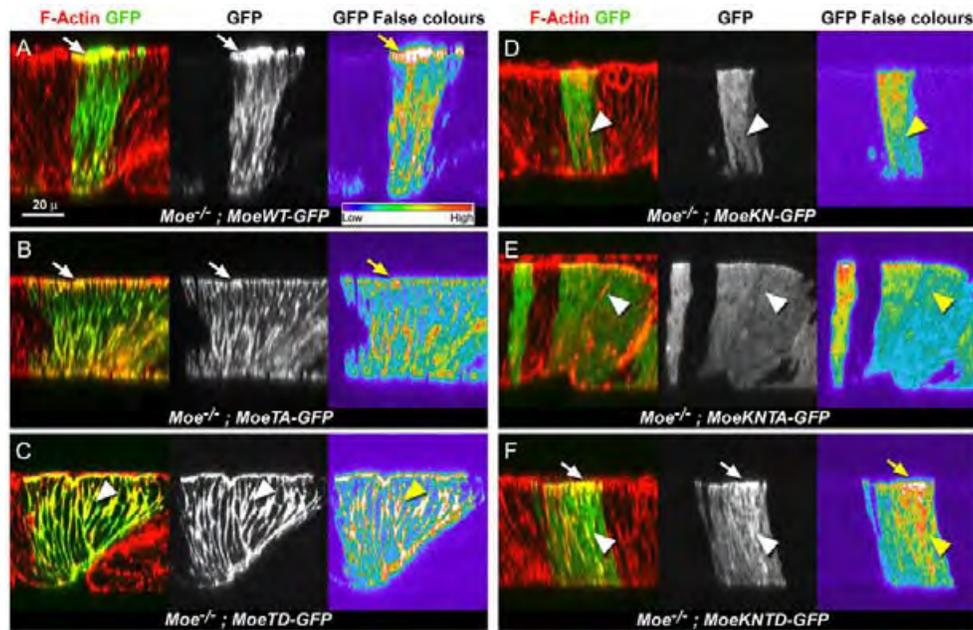


Fig. 5. Subcellular distribution of Moe-GFP mutants in the wing epithelium. Confocal longitudinal sections of third larval instar wing discs stained with Rhodamine-phalloidin to reveal F-actin (red). The discs contain *Moe* mutant clones expressing autonomously the different Moe-GFP tagged variants (GFP distribution shown in green, in greyscale panels and in false colours). Scale bar: 20 µm. (A) The MoeWT-GFP protein accumulates at the cell cortex in F-actin rich regions, especially in the apical part (arrows). It is also detected in the cytoplasm. (B) MoeTA-GFP is similarly distributed, but its apical accumulation is less prominent (arrows). (C) MoeTD-GFP is associated with the cell cortex and is observed at high levels in lateral regions, which accumulate high levels of F-actin (arrowheads). (D) MoeKN-GFP does not accumulate in actin-rich regions (arrowhead). (E) Similarly, MoeKNTA-GFP is homogeneously distributed in the cell body and does not accumulate in the cortex (arrowhead). (F) MoeKN-TD is associated with the cortical actin (arrowheads), mostly in the apical region (arrows).

expression of Skt1, PH-GFP accumulated at high levels in the most apical part of the cells (Fig. 7A,B), where we also observed the formation of abnormal membrane protrusions (Fig. 7B,D,F,I,J). This indicates that Skt1 overexpression boosts the PtdIns(4,5) P_2 levels in the apical domain of the wing cells, interfering with normal membrane organisation. Raising the PtdIns(4,5) P_2 levels also affected the localisation of both MoeTA-GFP (Fig. 7E,F) and MoeWT-GFP (Fig. 7C,D), which were then over-represented in the apical cortex. By contrast, the distribution of MoeKN-GFP was not altered in the presence of ectopic PtdIns(4,5) P_2 (Fig. 7G,H). We also monitored the phosphorylation state of endogenous Moe in the presence of ectopic Skt1. Our immunostaining revealed abnormal accumulation of Moe-P staining in the apical part of Skt1-overexpressing cells (Fig. 7I,J), and we also found increased levels of Moe-P in protein extracts obtained from the same discs (Fig. 7K). Thus, our results indicate that high PtdIns(4,5) P_2 levels can recruit Moe to the cell cortex, affecting both its subcellular distribution and its availability as a substrate for phosphorylation.

We also tested whether loss of the *skt1* gene is accompanied by a reduction of the Moe-P levels in the wing epithelium. In the ovaries, germ line clones for null *skt1* alleles induce a developmental arrest in early stages, but a clear reduction of Moe-P levels was observed in *skt1* hypomorphic backgrounds, which do not hinder ovary early development (Gervais et al., 2008). Wing epithelial integrity is compromised in homozygous mutant cells for the hypomorphic *skt1*^{Δ5} allele (Hassan et al., 1998), because we observed the presence of extruding cells in the most basal part of the disc when apoptosis was prevented by concomitant expression of the p35 anti-apoptotic factor (Hay et al., 1994) (supplementary material Fig. S3A,B). However, we did not detect a significant decrease of the Moe-P levels in these mutant cells (supplementary material Fig. S3C-F), a

negative result that is difficult to interpret because PtdIns(4,5) P_2 levels could only be slightly reduced in these clones.

Discussion

The aim of this work was to better understand how ERM protein activation is regulated in a developing organism and for this, *Drosophila* morphogenesis constitutes an attractive system in which to analyse the cellular mechanisms involved. We show that two highly conserved mechanisms control Moe activation: PtdIns(4,5) P_2 binding and phosphorylation of the invariant T559 residue. Thus, the study of the regulation of Moe in flies offers conclusions that could be extrapolated to ERM proteins of other species, including mammals. We show that substituting the endogenous Moe by point mutations affecting T559 phosphorylation or PtdIns(4,5) P_2 binding leads to distinguishable morphogenetic defects, thereby allowing genetic dissection of their respective contributions. Our results indicate that the role of PtdIns(4,5) P_2 is not restricted to a pre-activation step and instead, intrinsically regulates Moe subcellular localisation and activity.

Cellular levels of PtdIns(4,5) P_2 control ERM access to the membrane

Previous studies in mammalian cells have shown that ezrin directly binds to PtdIns(4,5) P_2 , allowing identification of two lysine doublets in the N-terminal FERM domain that are required for this interaction (Barret et al., 2000). These residues are conserved in the Moe protein and their replacement by asparagines (MoeKN) similarly blocks interaction with PtdIns(4,5) P_2 , suggesting that PtdIns(4,5) P_2 -binding is an ancient feature shared by all extant ERM proteins.

Our data support the view that these lysine residues act as a PtdIns(4,5) P_2 sensor, permitting efficient membrane recruitment of

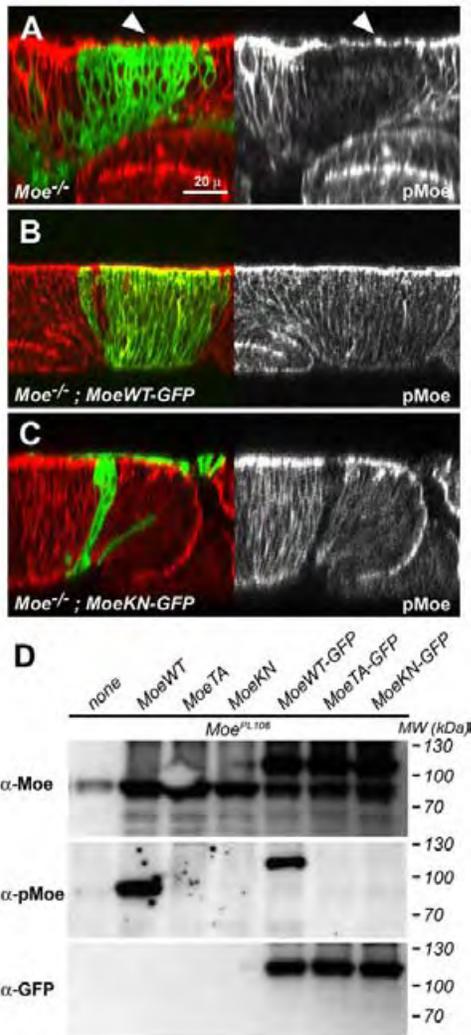


Fig. 6. PtdIns(4,5) P_2 binding is required for in vivo phosphorylation of Moe. (A-C) Confocal sections of third larval instar wing discs stained with anti-Moe-P (red). Only the red channel is shown on the right (black and white images). (A) *Moe* mutant cells marked by mCD8-GFP (green) show little Moe-P staining, except for some unspecific signal found in the nucleus. The staining observed in the most apical part of the disc corresponds to peripodial membrane cells that cover the wing epithelium and show normal accumulation of Moe-P (arrowheads). (B) *Moe*WT-GFP (green) becomes phosphorylated normally when is introduced in the *Moe* cells. (C) No Moe-P signal above background levels is detected in *Moe* clones expressing *Moe*KN-GFP (green). Scale bar: 20 μ m. (D) Blots showing the relative amounts of total Moe and phosphorylated Moe (pMoe) present in protein extracts of *Moe*^{PL106} adult males expressing different variants of Moe. Only the *Moe*WT and *Moe*WT-GFP proteins are significantly phosphorylated.

ERM proteins from a cytosolic pool of dormant molecules (Fig. 8). In the polarised wing cells, PtdIns(4,5) P_2 is found in the plasma membrane and accumulates in their most apical part – a region containing high levels of Moe. We show that the KN mutations block Moe recruitment to the cell cortex. Conversely, experimental elevation of the PtdIns(4,5) P_2 levels in the apical portion of the cell is accompanied by accumulation in the same region of *Moe*TA-GFP and *Moe*WT-GFP, but not *Moe*KN-GFP. Thus, these observations suggest that PtdIns(4,5) P_2 availability controls Moe access to the cell cortex and has an instructive role during this recruitment step,

which can be achieved independently of Moe phosphorylation. Our results confirm that, as with mammalian ezrin (Fievet et al., 2004), Moe phosphorylation cannot be achieved in wing cells if its interaction with PtdIns(4,5) P_2 is hindered by the KN mutations. Thus, PtdIns(4,5) P_2 binding appears to be a prerequisite for subsequent Moe phosphorylation. Moreover, we also observed increased amounts of phosphorylated Moe as a consequence of raising the PtdIns(4,5) P_2 levels in the wing, suggesting that kinase availability is not the limiting factor determining the degree of Moe phosphorylation in this tissue. Previous observations made in the fly ovary reported a reduction of phosphorylated Moe levels in mutant clones for a PIP5K *sktl* hypomorphic allele (Gervais et al., 2008). However, we did not observe the same reduction in the wing cells. This discrepancy might reflect the existence of genuine tissue differences affecting Moe regulation, but it is difficult to draw a conclusion at this stage, owing to possible genetic redundancy with other PIP5Ks encoded by *Drosophila* (for instance, the *PIP5K59B* gene) and the specific nature of the available *sktl* hypomorphic alleles, which all affect regulatory sequences that could be tissue specific (Gervais et al., 2008; Hassan et al., 1998).

Our genetic assays revealed that *Moe*KN still retains a low biological activity. If the KN mutations prevent PtdIns(4,5) P_2 binding, how can this protein still link F-actin to the cell cortex? Interestingly, recent work has shown that membrane association of vertebrate moesinKNTD and ezrinKNTD is sensitive to PtdIns(4,5) P_2 (Hao et al., 2009). Thus, although mutation of the lysine doublets prevents efficient access to the membrane, it does not completely abolish interaction with PtdIns(4,5) P_2 , which contributes to maintain ERM KNTD forms in the cortex. Crystallographic analyses of Ins P_3 -complexed Radixin show that the presumptive PtdIns(4,5) P_2 -interacting region is a cleft that is present in a highly positively charged surface of the FERM domain (Hamada et al., 2000). Interestingly, the two conserved lysine doublets are in this charged surface, but not located in the cleft that interacts with Ins P_3 . It is tempting to speculate that PtdIns(4,5) P_2 could first interact with the charged surface of ERM proteins and favour membrane recruitment before lodging into the cleft and promote ERM activation. Our results suggest that a small fraction of *Moe*KN could reach the membrane compartment, presumably by stochastic motion, and then interact with PtdIns(4,5) P_2 via its intact FERM cleft. The fly *Moe*KNTD form is more efficiently recruited to the cortex and displays a higher activity than *Moe*KN because this open molecule can also interact with F-actin. Indeed, *Moe*KNTD is found preferentially in regions rich in F-actin. Finally, *Moe*TD displays the highest affinity for the cortex because of its ability to bind both PtdIns(4,5) P_2 and F-actin. Moreover, its presence in the cortex triggers accumulation of F-actin, which in turn could allow further recruitment of *Moe*TD, as seen in both S2 cells and lateral regions of wing cells.

Moe phosphorylation in T559 is not essential for its activation

A surprising finding of our studies is that a *Moe* form that cannot be phosphorylated in T559 still displays significant activity in various developmental processes. Although overexpression of such forms partly counteracts endogenous ERM protein activity in both wild-type and pathological contexts (Carreno et al., 2008; Chorna-Ornan et al., 2005; Khanna et al., 2004; Polesello et al., 2002; Yu et al., 2004), our genetic assays show that *Moe*TA has a rescuing activity in the absence of the endogenous product. *Moe*TA, which can associate with the membrane, significantly improves the

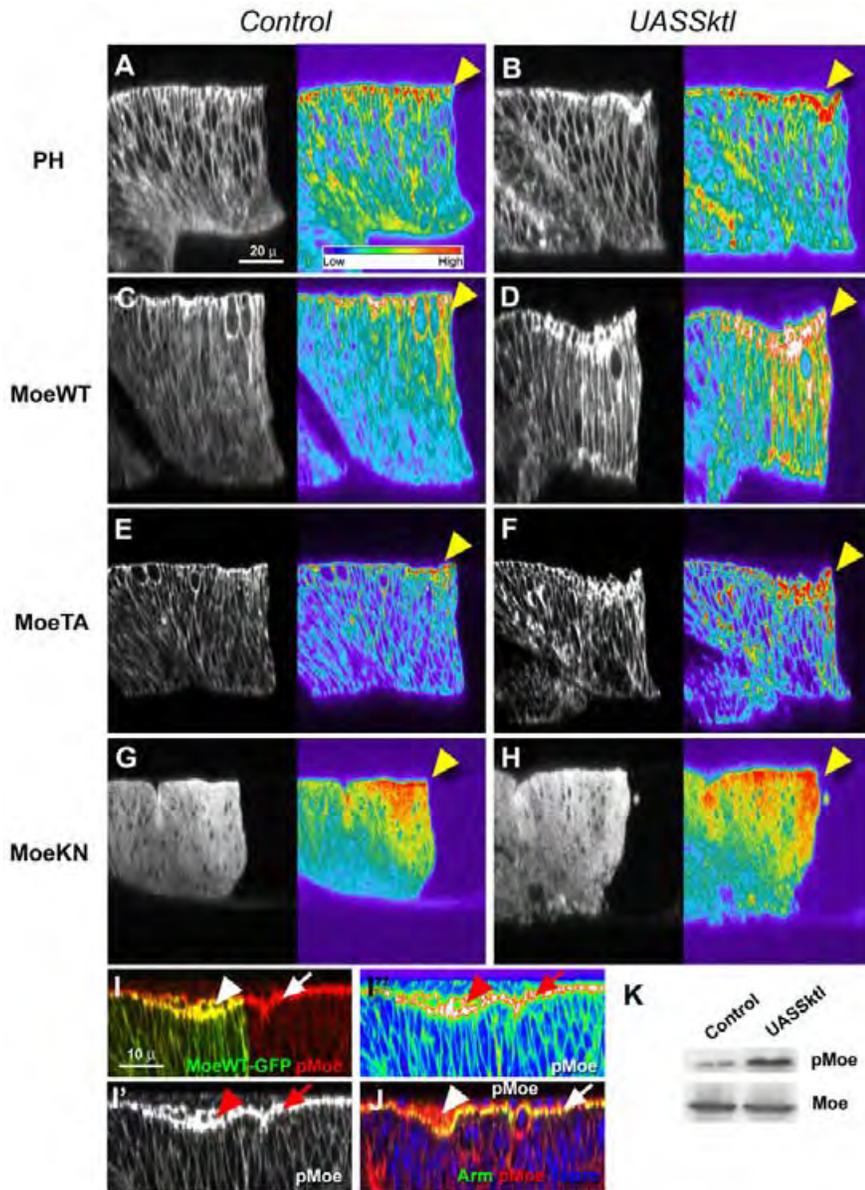


Fig. 7. Increasing levels of PtdIns(4,5) P_2 in the wing epithelium induce Moe recruitment and phosphorylation in the apical part of the epithelium. Confocal sections of the wing showing the localisation of PH-GFP (A,B), MoeWT-GFP (C,D,I), MoeTA-GFP (E,F) and MoeKN-GFP (G,H) in either wild type (A,C,E,G) or in cells overexpressing the PIP5KI SktI (B,D,F,H,I,J). GFP-fusion proteins and SktI were coexpressed in the dorsal half of the disc pouch, using the *apterousGALA* driver. SktI overexpression induces the formation of apical membrane protrusions containing high levels of PtdIns(4,5) P_2 , as shown by accumulation of the PH-GFP reporter (B, yellow arrowhead). In SktI-expressing cells, MoeWT-GFP (D) and MoeTA-GFP (F) accumulate in cell apical protrusions (yellow arrowheads). The MoeKN-GFP distribution is not affected by presence of high levels of PtdIns(4,5) P_2 (compare G and H).

(I) Overexpression of SktI in dorsal cells (marked by MoeWT-GFP, green) triggers accumulation of Moe-P (red) in PtdIns(4,5) P_2 -rich apical protrusions that belong to the epithelial cells (seen in yellow, white arrowheads) and not the peripodial membrane. The Moe-P channel is also shown in grey (I') and in false colour (I''). Moe-P normal levels, as seen in cells not expressing SktI are labelled with arrows. (J) In dorsal SktI-overexpressing cells Moe-P staining (red, white arrowhead) is seen above apical junctions (indicated by Armadillo localisation, green). A small arrow indicates ventral cells not expressing SktI.

(K) Protein extracts from third larval instar imaginal discs corresponding to wild-type flies (control) or flies overexpressing SktI (UASSktI). Immunoblot with a Moe-P-specific antibody (upper panel) shows that overexpression of SktI increases the fraction of phosphorylated Moe. Equal amounts of Moe protein were loaded in each lane (lower panel). Scale bar: 20 μ m A-H; 10 μ m I-J.

viability of *Moe* mutant flies, including the strong *Moe*^{PL54} allele. Detailed examination of wing mosaics containing *Moe* mutant cells further illustrate that phosphorylation of Moe T559 is dispensable for the integrity of this epithelium. These observations indicate that, at least for certain aspects of tissue homeostasis, regulation via PtdIns(4,5) P_2 binding could be sufficient to control Moe distribution and activity, although we cannot formally exclude the possibility that Moe phosphorylation in other unknown residues also contributes to activation of the MoeTA form. Although our results appear in conflict with previous reports (Hipfner et al., 2004; Speck et al., 2003), it is worth noticing that these latter studies used Moe forms carrying a N-terminal Myc tag, which could significantly affect Moe activity. Our results show that Moe proteins tagged with GFP at the C-terminus have a reduced activity when compared with their full-length equivalents. If addition of an N-terminal tag further reduces the activity of tested proteins, it would explain why previous studies failed to detect a rescue with MoeTA (Hipfner et al., 2004; Speck et al., 2003). However, this

tag would reduce the toxic effect of MoeTD sufficiently to obtain a weak rescue (Hipfner et al., 2004; Speck et al., 2003), similarly to what we observe expressing an untagged MoeKNTD form.

Our results therefore allow us to postulate the existence of a pool of open, non-phosphorylated Moe molecules that nonetheless can fulfil in vivo their role as linkers between the actin cytoskeleton and the membrane (Fig. 8). The idea that different active ERM forms, phosphorylated and not phosphorylated, could coexist at the cell cortex is also consistent with results from kinetic analyses showing the existence of three different pools of ezrin in the membrane of cultured cells (Coscoy et al., 2002). Although stable and highly mobile molecules could respectively correspond to phosphorylated and PtdIns(4,5) P_2 -bound ezrin, the pool of molecules displaying intermediate mobility in the cell cortex could reflect the presence of unphosphorylated ezrin interacting with actin filaments and membrane proteins. In any case, our data provide unambiguous evidence that active ERM protein distribution cannot be faithfully deduced from the ERM phosphorylation pattern.

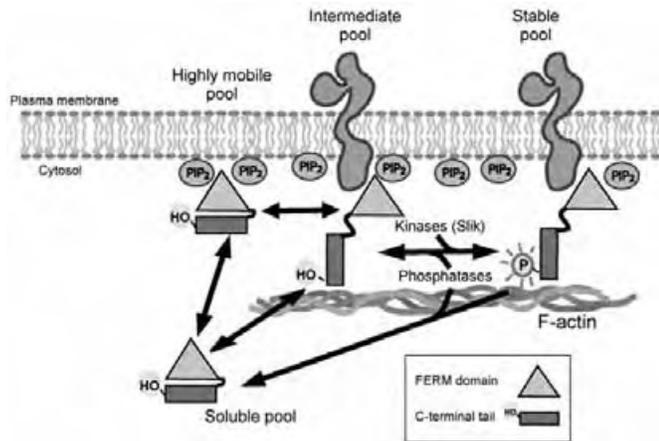


Fig. 8. A general model for the regulation of ERM protein activity. Presence of high levels of PtdIns(4,5) P_2 recruits ERM proteins to the membrane from a cytoplasmic pool of dormant molecules. The non-phosphorylated ERM form can associate with actin filaments and membrane components, such as integral membrane proteins, acting as a link between these two structures. This PtdIns(4,5) P_2 -mediated recruitment step is also required for ERM phosphorylation by its specific kinases, such as *Drosophila* Slik. Stable association of ERM proteins with the membrane and the actin cortex, required in specific cellular contexts, is promoted by phosphorylation.

Fine-tuning ERM protein activity

Previous work has shown that Moe has an essential role during eye differentiation, where it is required for the morphogenesis of the highly specialised microvilli that constitute the photoreceptor rhabdomeres (Karagiannis and Ready, 2004). These large membrane protrusions accumulate high levels of PtdIns(4,5) P_2 and phosphorylated Moe (Karagiannis and Ready, 2004; Stauffer et al., 1998; Zelhof and Hardy, 2004). Consistently, our rescue experiments show that eye morphogenesis requires proper Moe regulation by both phosphorylation and PtdIns(4,5) P_2 binding. Although MoeTA is sufficient to restore the viability of *Moe* mutants, the eye phenotype is not suppressed in rescued animals, showing that T559 phosphorylation is crucial in this tissue. Phosphorylation might be essential to provide a stable association between Moe and its partners in these specialised giant villi of the apical domain. The situation in the undifferentiated wing epithelium appears different, because expression of MoeTA in this tissue is enough to ensure epithelial integrity. These results indicate that, depending of the cellular context, transient or stable association of ERM proteins with the cortex can be the preferred choice. Modulation of PtdIns(4,5) P_2 levels would allow a dose-sensitive activation of ERM molecules at the membrane, with phosphorylation being a secondary step necessary for the formation and maintenance of specialised cellular structures.

The aberrant morphology of S2 and wing cells and the developmental lethality induced by MoeTD show that an open form, mimicking a constitutively phosphorylated molecule has strong effects on cell organisation and morphogenesis. Thus, phosphorylation-dephosphorylation cycles are also an important aspect in the regulation of Moe function during development. The ability to cycle between phosphorylated and dephosphorylated Moe has been shown to be necessary for photoreceptor physiology, suggesting that Moe dephosphorylation mediates remodelling of photoreceptor cytoarchitecture in response to light (Chorna-Ornan et al., 2005). Recent work further suggests that local hydrolysis of

PtdIns(4,5) P_2 after phospholipase-C (PLC) activation, as it is the case in phototransduction, can contribute to the fast removal of ERM proteins from the plasma membrane (Hao et al., 2009).

A system of double regulation based on activation by PtdIns(4,5) P_2 levels and stabilisation by phosphorylation has evolved to finely tune the activity of ERM proteins in a whole set of different cellular structures and developmental situations. Clearly, this feature contributes to the versatility of ERM proteins and helps to explain why they have a central role in such a varied number of morphogenetic processes.

Materials and Methods

Generation of DMoeKN mutants

Moe cDNA was subcloned in the pGEX-4T1 plasmid, allowing production of GST-Moe fusion protein. MoeKN was generated by mutation of lysine 254, 255, 262, 263 to asparagine, as previously done for human ezrin (Barret et al., 2000). The KN mutations were generated by replacement of the *NcoI-BspEI* wild-type fragment in pGEX-Moe with a set of overlapping mutant oligonucleotides (Eurogentec). To produce MoeKN GFP-tagged versions, the *Pfl23II-BspEI* fragment carrying the KN mutation was inserted in the corresponding MoeWT-GFP, MoeTA-GFP, MoeTD-GFP plasmids (Polesello et al., 2002). These constructs were then subcloned into pAc5.1 (Invitrogen) for S2 cell transfection and into pUASp for generation of transgenic lines. For transgenic lines encoding untagged proteins, the full-length *Moe* coding region was amplified by PCR and cloned into pUASp.

Protein expression and purification

Plasmids encoding GST-Moe were used to transform TG1 bacteria. After overnight growth, IPTG (0.5 mM) was added for 1 hour and bacteria centrifuged at 4000 r.p.m. for 15 minutes. All further details refer to 1 litre culture. Bacteria pellets were sonicated in 15 ml PBS containing 5 mM EDTA and protease inhibitors (Complete from Roche). Samples were then centrifuged at 40,000 *g* for 30 minutes. Supernatants were diluted to 50 ml and 3 ml glutathione agarose beads slurry (v/v) was added. After incubation for 2 hours at 4°C, beads were washed with 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 100 mM NaCl. When the OD₂₈₀ was 0, 100 U benzonase was added for 45 minutes at room temperature. After washing the beads, gels were equilibrated in the same buffer supplemented with 2.5 mM CaCl₂. Thrombin (50 U) was then added and samples incubated for 1 hour at 37°C. Cleaved proteins were eluted and their concentration calculated, taking into account their extinction coefficient. To avoid interference of calcium with the different assays involving phospholipids, EGTA (5 mM) was added to the recombinant proteins, which were stored at 4°C and used within 48 hours.

Liposome-binding assay

Phospholipids (PC, PS and PE) and PtdIns(4,5) P_2 were purchased from Sigma and Lipid Products (Redhill, UK). Lipids, resuspended in water, were mixed in the appropriate proportions and dried using a Speedvac. Dry pellets were then allowed to swell in 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 containing 1 mM EGTA at 42°C for 2 hours. After liposome incubation with the Moe proteins overnight, samples were centrifuged for 30 minutes in a 42.2 Ti rotor (Beckman) at 100,000 *g*. Supernatant and pellet samples were then analysed by western blotting. Antibodies against Moe and secondary anti-rabbit antibodies coupled to HRP were used at a 1:10,000. Primary antibodies were first incubated with GST-agarose beads to minimize crossreactivity with GST. Blots were developed using the ECL kit (Amersham) and quantification was performed using the ImageJ software.

Cell culture and immunohistochemistry

S2 cells were maintained in Schneider's *Drosophila* medium (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated FCS (GIBCO) and penicillin-streptomycin. Cells were transfected using Fugene-6 according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics) and observed 24 hours later. Cells were allowed to spread for 1 hour on No. 1.5 coverslips (Corning) previously treated with 20 μ l of 0.5 mg/ml concanavalin A (Sigma) in water and allowed to air dry (Rogers et al., 2002). Cells were then fixed for 20 minutes in BRB80 buffer (80 mM PIPES, pH 6.9, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) containing 3% formaldehyde (EM Sciences) and 1 mg/ml saponin. Blocking and permeabilisation was performed in TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 154 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂) containing 2% BSA and 0.02% saponin for 1.5 hours. Coverslips were then incubated for 30 minutes on 20 μ l droplets of Texas-Red-phalloidin 1:100 (Molecular Probes) in TBS-BSA-saponin. After washes in TBS-BSA-saponin (15 minutes) and TBS (twice for 15 minutes), coverslips were mounted onto glass slides using Hardset VectaShield (Vector). Images were acquired using a Leica DMIRE2 inverted microscope with a MICROMAX-1300Y-HS cooled camera (Princeton Instrument). Fluorescence levels were quantified by analysing image stacks (recorded using the same settings) with the ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Morphometry analyses were performed using calculation of the circularity index of ImageJ.

Wing discs were dissected in PBS, fixed for 20 minutes in paraformaldehyde 4% in PBS and incubated overnight in Rhodamine phalloidin (Sigma) and 10 mM Topro3

(Molecular Probes) in PBS-Tween 0.1%. After three 30 minutes washes in PBS 0.1% Tween20, discs were mounted in Vectashield (Vector). Primary antibodies were rabbit anti-Moe-P, 1:500 (Karagiosis and Ready, 2004), rabbit anti-activated Caspase3, 1:100 (Cell Signalling), mouse anti-arm, 1:100 (DSHB). We used as secondary antibodies Rhodamine anti-rabbit, FITC anti-mouse and Cy5 anti-mouse, all diluted 1:300 (Jackson Laboratories). For immunostaining, discs were fixed as above and incubated overnight with the corresponding primary antibody dilutions in PBS 0.3% Triton X-100, 1% BSA. Samples were visualised with a Leica TCS SP2 confocal microscope. False colours images were generated applying the Rainbow LUT of the ImageJ software to disc pictures obtained using the same confocal settings.

Fly strains

The following strains were used: *ywMoe^{PL54}*, *ywMoe^{PL106}* (Polesello et al., 2002), *ywFRT19A*, *tubulin-GAL4^{LL7}* (Lee and Luo, 1999), *apterousGAL4^{md544}* (Calleja et al., 1996), *UASMoeWT-GFP*, *UASMoeTA-GFP*, *UASMoeTD-GFP* (Polesello et al., 2002), *UASPH-GFP* (Zelhof and Hardy, 2004), *skt^{L5}* and *UASSkt* (Hassan et al., 1998) and *UASp35^{BH2}* (Hay et al., 1994). The transgenic lines *UASMoeWT*, *UASMoeKN*, *UASMoeTA*, *UASMoeTD*, *UASMoeKNTA*, *UASMoeKNTD*, *UASMoeKN-GFP*, *UASMoeKNTA-GFP* and *UASMoeKNTD-GFP* were generated in this work. For rescue experiments, *ywMoe^{PL54}/FM6*; *tubulin-GAL4^{LL7}/TM2* and *ywMoe^{PL106}/FM6*; *tubulin-GAL4^{LL7}/TM2* females were crossed to males carrying the different *UASMoe^{Mut}* insertions in an autosome. We calculated for each cross the ratio between the observed number of *ywMoe^{Mut}*; *tubulin-GAL4^{LL7}/UASMoe^{Mut}* surviving males and the *ywMoe^{+/+}*; *TM2/UASMoe^{Mut}* female siblings. This ratio should be 1 for a total rescue. Wing disc clones were generated using the MARCM system (Lee and Luo, 1999), giving 1 hour heatshock at 37°C to first instar larvae. *Moe^{PL106/PL106}* positively labelled cells were generated in *ywMoe^{PL106} FRT19A/hsFLP¹ tubulin-GAL80^{LL1} FRT19A*; *UASmCD8GFP^{LL5}/+*; *tubulin-GAL4^{LL7}/+* females. The *Moe^{PL106/PL106}* mutant clones rescued by the different *Moe^{Mut}-GFP* versions were obtained using the stocks *ywMoe^{PL106} FRT19A/hsFLP¹ tubulin-GAL80^{LL1} FRT19A*; *UASMoe^{Mut}-GFP/+*; *tubulin-GAL4^{LL7}/+*. The *skt^{L5}* mutant clones were observed in larvae of the genotype *elav^{C155} UASmCD8GFP^{LL4} hsFLP¹; FRTG13 tubulin-GAL80^{LL2}/FRTG13 skt^{L5}; tubulin-GAL4^{LL7}/UASp35^{BH2}*. All crosses were done at 25°C.

Cuticle imaging

Adult flies were dehydrated in absolute ethanol, coated with colloidal gold and visualised with a Hitachi scanning electron microscope. Wings were mounted in 6:5 ethanol:lactic acid and visualised with a Zeiss Axiophot microscope.

Analysis of fly extracts

30 wing imaginal discs per genotype were dissected in PBS, pooled together, brought to 20 µl with PBS and homogenised by boiling in 10 µl of 3× Laemmli buffer. Then, 20 µl homogenate was loaded on an SDS-PAGE gel for immunodetection with anti-Moe-P antibody. 3 µl of the same sample was loaded on a different gel for immunodetection with anti-Moe used at 1:50,000. Four adult flies for each genotype were homogenised in 100 µl of boiling Laemmli 3× buffer and 5 µl homogenate was loaded on an SDS-PAGE gel and blotted with anti-Moe or anti-Moe-P in the same conditions. Signal was detected using the ECL kit from Amersham.

We are grateful to H. Bellen, D. Ready, A. Zelhof, the Bloomington Stock Center and the Iowa DSHB for stocks and antibodies. We also wish to thank three anonymous referees for their constructive comments on the manuscript. This work was supported by grants from the ACI Biologie du Développement et Physiologie Intégrative (030023), ARC (3832), FRM (Equipe 2005) and the Canadian Institutes for Health Research (MOP-89877). C.P. was supported by the Ministère de la Recherche and ARC (1114), C.R. by the Ministère de la Recherche and a Lavoisier fellowship. S.C. is a FRSQ 'Junior I' fellow. F.R. benefited from a Long Term EMBO fellowship.

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/123/12/2058/DC1>

References

Barret, C., Roy, C., Montcourrier, P., Mangeat, P. and Niggli, V. (2000). Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution. *J. Cell Biol.* **151**, 1067-1080.

Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.

Bretscher, A., Edwards, K. and Fehon, R. G. (2002). ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 586-599.

Calleja, M., Moreno, E., Pelaz, S. and Morata, G. (1996). Visualization of gene expression in living adult *Drosophila*. *Science* **274**, 252-255.

Carreno, S., Kouranti, I., Glusman, E. S., Fuller, M. T., Echard, A. and Payre, F. (2008). Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J. Cell Biol.* **180**, 739-746.

Chorna-Ornan, I., Tzarfaty, V., Ankri-Eliahoo, G., Joel-Almagor, T., Meyer, N. E., Huber, A., Payre, F. and Mink, B. (2005). Light-regulated interaction of Dmoesin with TRP and TRPL channels is required for maintenance of photoreceptors. *J. Cell Biol.* **171**, 143-152.

Coscoy, S., Waharte, F., Gautreau, A., Martin, M., Louvard, D., Mangeat, P., Arpin, M. and Amblard, F. (2002). Molecular analysis of microscopic ezrin dynamics by two-photon FRAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 12813-12818.

Fievet, B. T., Gautreau, A., Roy, C., Del Maestro, L., Mangeat, P., Louvard, D. and Arpin, M. (2004). Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J. Cell Biol.* **164**, 653-659.

Gary, R. and Bretscher, A. (1995). Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1061-1075.

Gervais, L., Claret, S., Januschke, J., Roth, S. and Guichet, A. (2008). PIP5K-dependent production of PIP2 sustains microtubule organization to establish polarized transport in the *Drosophila* oocyte. *Development* **135**, 3829-3838.

Hamada, K., Shimizu, T., Matsui, T., Tsukita, S. and Hakohsima, T. (2000). Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain. *EMBO J.* **19**, 4449-4462.

Hao, J. J., Liu, Y., Kruhlak, M., Debell, K. E., Rellahan, B. L. and Shaw, S. (2009). Phospholipase C-mediated hydrolysis of PIP2 releases ERM proteins from lymphocyte membrane. *J. Cell Biol.* **184**, 451-462.

Hassan, B. A., Prokopenko, S. N., Breuer, S., Zhang, B., Paululat, A. and Bellen, H. J. (1998). skittles, a *Drosophila* phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase, is required for cell viability, germline development and bristle morphology, but not for neurotransmitter release. *Genetics* **150**, 1527-1537.

Hay, B. A., Wolff, T. and Rubin, G. M. (1994). Expression of baculovirus P35 prevents cell death in *Drosophila*. *Development* **120**, 2121-2129.

Hayashi, K., Yonemura, S., Matsui, T. and Tsukita, S. (1999). Immunofluorescence detection of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins with their carboxyl-terminal threonine phosphorylated in cultured cells and tissues. *J. Cell Sci.* **112**, 1149-1158.

Hipfner, D. R., Keller, N. and Cohen, S. M. (2004). Slik Sterile-20 kinase regulates Moesin activity to promote epithelial integrity during tissue growth. *Genes Dev.* **18**, 2243-2248.

Karagiosis, S. A. and Ready, D. F. (2004). Moesin contributes an essential structural role in *Drosophila* photoreceptor morphogenesis. *Development* **131**, 725-732.

Khanna, C., Wan, X., Bose, S., Cassaday, R., Olomu, O., Mendoza, A., Yeung, C., Gorlick, R., Hewitt, S. M. and Helman, L. J. (2004). The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat. Med.* **10**, 182-186.

Kunda, P., Pelling, A. E., Liu, T. and Baum, B. (2008). Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. *Curr. Biol.* **18**, 91-101.

Lee, T. and Luo, L. (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-461.

Matsui, T., Maeda, M., Doi, Y., Yonemura, S., Amano, M., Kaibuchi, K. and Tsukita, S. (1998). Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell Biol.* **140**, 647-657.

McCartney, B. M. and Fehon, R. G. (1996). Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the *Drosophila* homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J. Cell Biol.* **133**, 843-852.

Nakamura, F., Huang, L., Pestonjamas, K., Luna, E. J. and Furthmayr, H. (1999). Regulation of F-actin binding to platelet moesin in vitro by both phosphorylation of threonine 558 and polyphosphatidylinositides. *Mol. Cell Biol.* **10**, 2669-2685.

Niggli, V., Andreoli, C., Roy, C. and Mangeat, P. (1995). Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Lett.* **376**, 172-176.

Pearson, M. A., Reczek, D., Bretscher, A. and Karplus, P. A. (2000). Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell* **101**, 259-270.

Polesello, C. and Payre, F. (2004). Small is beautiful: what flies tell us about ERM protein function in development. *Trends Cell Biol.* **14**, 294-302.

Polesello, C., Delon, I., Valenti, P., Ferrer, P. and Payre, F. (2002). Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat. Cell Biol.* **4**, 782-789.

Rasmussen, M., Alexander, R. T., Darborg, B. V., Mobjerg, N., Hoffmann, E. K., Kapus, A. and Pedersen, S. F. (2008). Osmotic cell shrinkage activates ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins: activation mechanisms and physiological implications. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **294**, C197-C212.

Rogers S. L., Rogers G. C., Sharp D. J., Vale R. D. (2002). *Drosophila* EB1 is important for proper assembly, dynamics, and positioning of the mitotic spindle. *J. Cell Biol.* **158**, 873-884.

Speck, O., Hughes, S. C., Noren, N. K., Kulikauskas, R. M. and Fehon, R. G. (2003). Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. *Nature* **421**, 83-87.

Stauffer, T. P., Ahn, S. and Meyer, T. (1998). Receptor-induced transient reduction in plasma membrane PtdIns(4,5)P2 concentration monitored in living cells. *Curr. Biol.* **8**, 343-346.

Turunen, O., Wahlstrom, T. and Vaheri, A. (1994). Ezrin has a COOH-terminal actin-binding site that is conserved in the ezrin protein family. *J. Cell Biol.* **126**, 1445-1453.

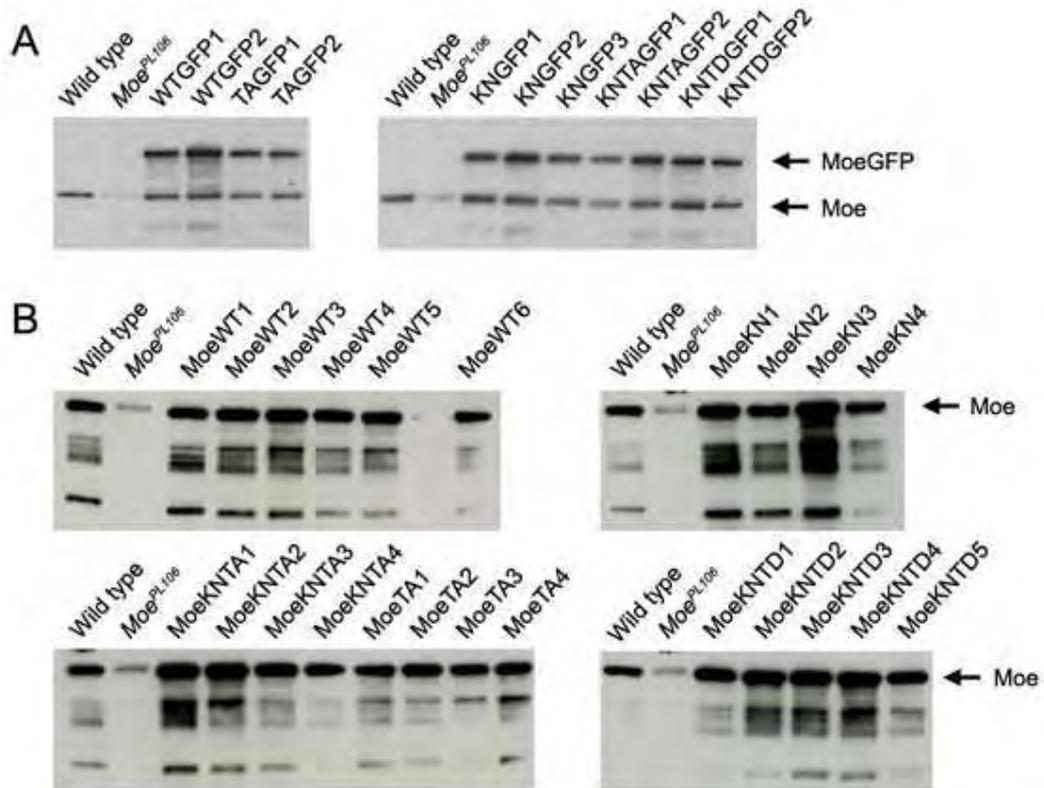
Yin, H. L. and Janney, P. A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 761-789.

Yonemura, S., Matsui, T. and Tsukita, S. (2002). Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J. Cell Sci.* **115**, 2569-2580.

Yu, Y., Khan, J., Khanna, C., Helman, L., Meltzer, P. S. and Merlino, G. (2004). Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat. Med.* **10**, 175-181.

Zelhof, A. C. and Hardy, R. W. (2004). WASp is required for the correct temporal morphogenesis of rhabdomere microvilli. *J. Cell Biol.* **164**, 417-426.

Figure S1, *Roch & al*

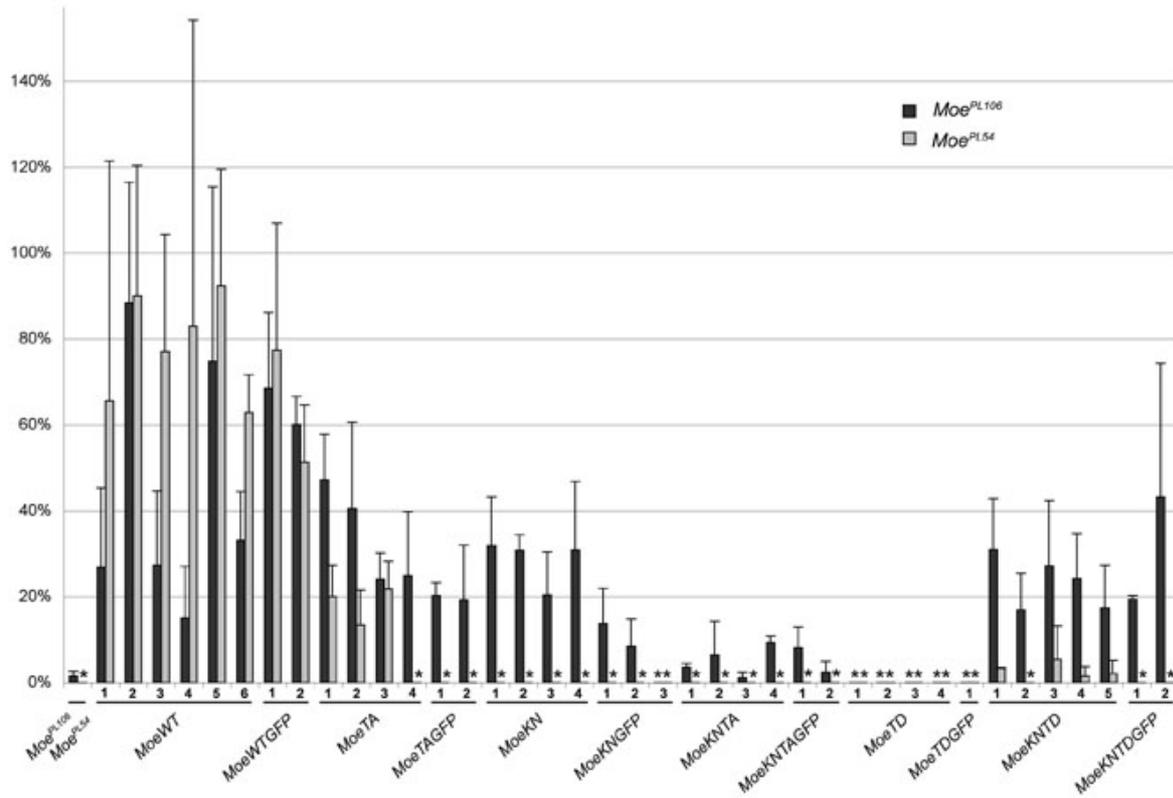


Supplemental Figure S1

(A) Moe immunoblots showing the amount of exogenous (Moe-GFP) and endogenous (Moe) protein found in extracts obtained from adult wild-type males expressing each transgenic line with the same tubulin-GAL4 driver.

(B) Moe immunoblots showing the amount of exogenous Moe protein found in total extracts from rescued *Moe^{PL106}* adult males expressing each transgenic line under the control of the same driver. A volume of total extract equivalent to 0.2 flies was loaded in each lane. The full-size Moe band is indicated with an arrow. Extra bands are degradation products, as we only detect them occasionally and their intensity is proportional to that seen for the full-size band. Wild-type and *Moe^{PL106}* males serve as controls in both experiments.

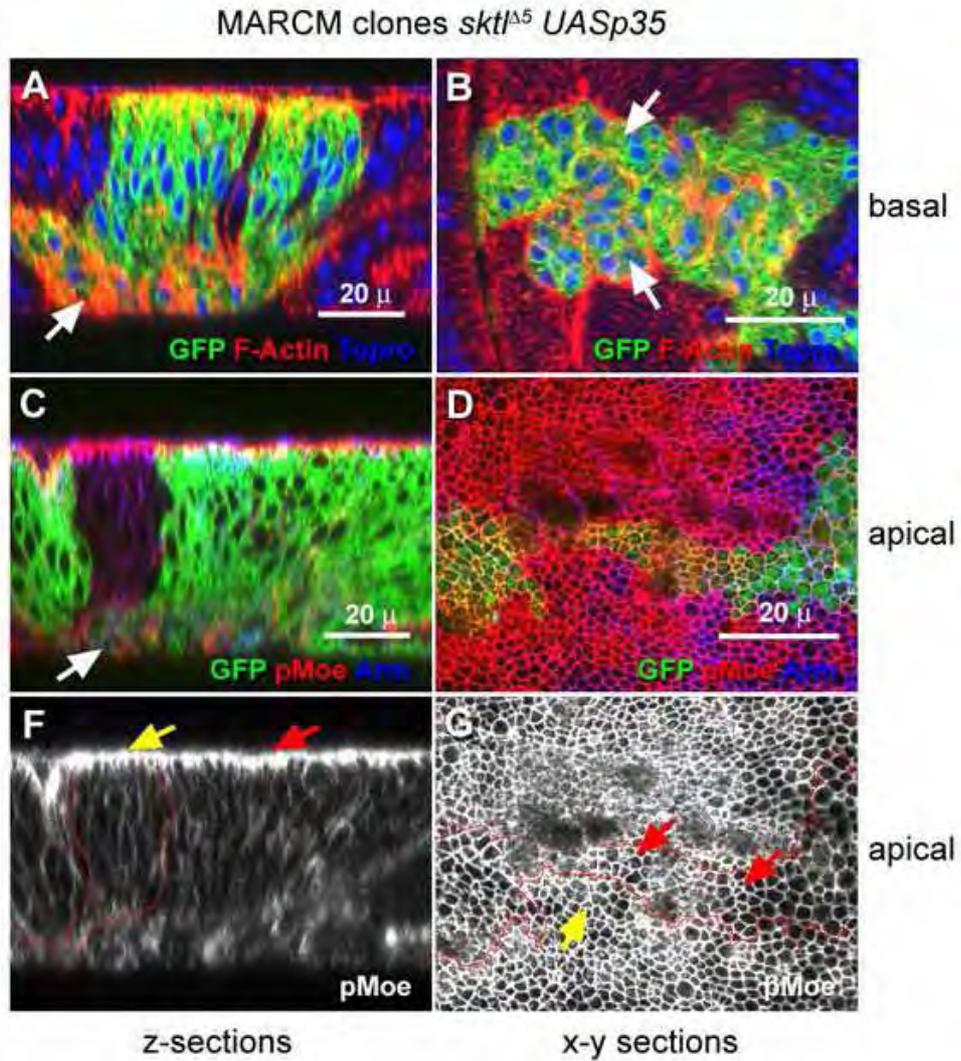
Figure S2, Roch & al



Supplemental Figure S2

Graph representing the percentage of *Moe^{PL106}* (dark bars) or *Moe^{PL54}* (grey bars) mutant flies reaching the adult stage after rescue with the different *Moe* mutant versions (males *Moe*⁻; tubulin-GAL4/UAS*Moe*Mut). Each bar of the histogram represents the average rescue observed in at least two independent experiments (four in most cases). Error bars indicate s.d. Asterisks label lethal combinations.

Figure S3, *Roch & al*



Supplemental Figure S3

skt^{Δ5} third larval instar wing clones overexpressing the anti-apoptotic protein p35, generated in first instar larvae with the MARCM technique. (A,B) Some *skt^{Δ5}* mutant cells (marked in green) are observed extruding in the basal side of the disc (arrows). (C-G) pMoe accumulates normally in both *skt^{Δ5}* mutant cells (red arrows) and in the neighbouring wild-type cells (yellow arrows).

II.

**En intégrant deux réseaux de signalisation
PI(4,5)P2 – dépendant et Slik/Pp1-87B - dépendant,
la dMoésine participe à la morphogénèse cellulaire
des cellules mitotiques.**

La division cellulaire conduit à la formation de deux cellules filles au contenu génétique identique à celui de la cellule mère. Ce processus nécessite une synchronisation entre la ségrégation des chromosomes et le clivage de la cellule mère, permise notamment par des modifications successives de la forme cellulaire. Bien que ce remodelage cortical propre aux cellules mitotiques ait été décrit par Walther Flemming il y a plus de cent cinquante ans [7], les mécanismes moléculaires contrôlant la morphogénèse cellulaire des cellules mitotiques ne sont toujours pas parfaitement identifiés. Le remodelage du cortex cellulaire implique une étroite collaboration entre le cytosquelette d'Actine d'une part et les composantes de la membrane plasmique de l'autre. La structure de cette couche corticale n'est pas totalement élucidée, et les mécanismes permettant d'établir cette liaison dynamique entre le cytosquelette d'Actine et la membrane plasmique à la transition interphase – mitose et à chacune des phases mitotiques restent en partie à caractériser.

Une étude antérieure à mon arrivée au laboratoire montre que l'activation de la dMoésine, dépendante de la kinase Slik, participe à la stabilité corticale et à la localisation du fuseau mitotique [63]. Conjointement, l'équipe de B.Baum a mis en évidence que l'activation de la dMoésine est entre autres nécessaire à l'arrondissement des cellules à l'entrée en division, révélant que les protéines de la famille ERM participent à la morphogénèse cellulaire en mitose [47].

Notre travail actuel met en évidence le rôle de la dMoésine dans le processus mitotique, et plus particulièrement l'importance de sa distribution anisotrope en anaphase et télophase. En intégrant deux réseaux de régulation contrôlant à la fois temporellement et spatialement son activation, la dMoésine participe (i) à l'arrondissement des cellules en prophase, prométaphase et métaphase, (ii) à l'élongation cellulaire en anaphase B et (iii) à la relaxation corticale en fin de division.

Nos données démontrent premièrement que la phosphatase Pp1-87B inactive la dMoésine dès la fin de la division, en reversant l'activation par phosphorylation induite par la kinase Slik. Cette balance entre l'activité kinase activatrice de Slik et l'activité phosphatase inhibitrice de Pp1-87B permet de réguler temporellement l'activation de la dMoésine en adéquation avec le cycle cellulaire.

Deuxièmement, nous mettons en évidence que la distribution du PI(4,5)P₂ régule spatialement la dMoésine, et est nécessaire à sa localisation corticale à l'entrée en mitose

puis à son enrichissement à l'équateur et au sillon de clivage en anaphase et télophase. Bien que l'importance du PI(4,5)P2 dans le processus mitotique ait déjà été démontrée par de nombreuses études, les mécanismes à l'origine de sa distribution anisotrope en anaphase et télophase ne sont pas parfaitement identifiés. Par une approche de crible candidats sur l'ensemble des enzymes impliquées dans le métabolisme des phosphoinositides, nous trouvons que la dynamique de localisation de Skittles et de Pten contrôlent la distribution du PI(4,5)P2. Celle-ci, isotrope de la prophase à la métaphase puis anisotrope en anaphase et télophase, participe à la morphogénèse cellulaire des cellules mitotiques en contrôlant spatialement l'activation de la dMoésine.

Enfin, nos données montrent que l'intégration des deux réseaux de régulation (i) Slik / Pp21-87B et (ii) Skittles / Pten / PI(4,5)P2 est critique pour la morphogénèse cellulaire des cellules en division. En effet, l'inactivation de la dMoésine au cortex polaire est requise pour l'élongation des cellules en anaphase et le clivage de la cellule mère. Simultanément, un recrutement transitoire et local de la dMoésine au cortex des blebs polaires est essentiel pour induire leur rétraction et maintenir ainsi la stabilité corticale.

JCB

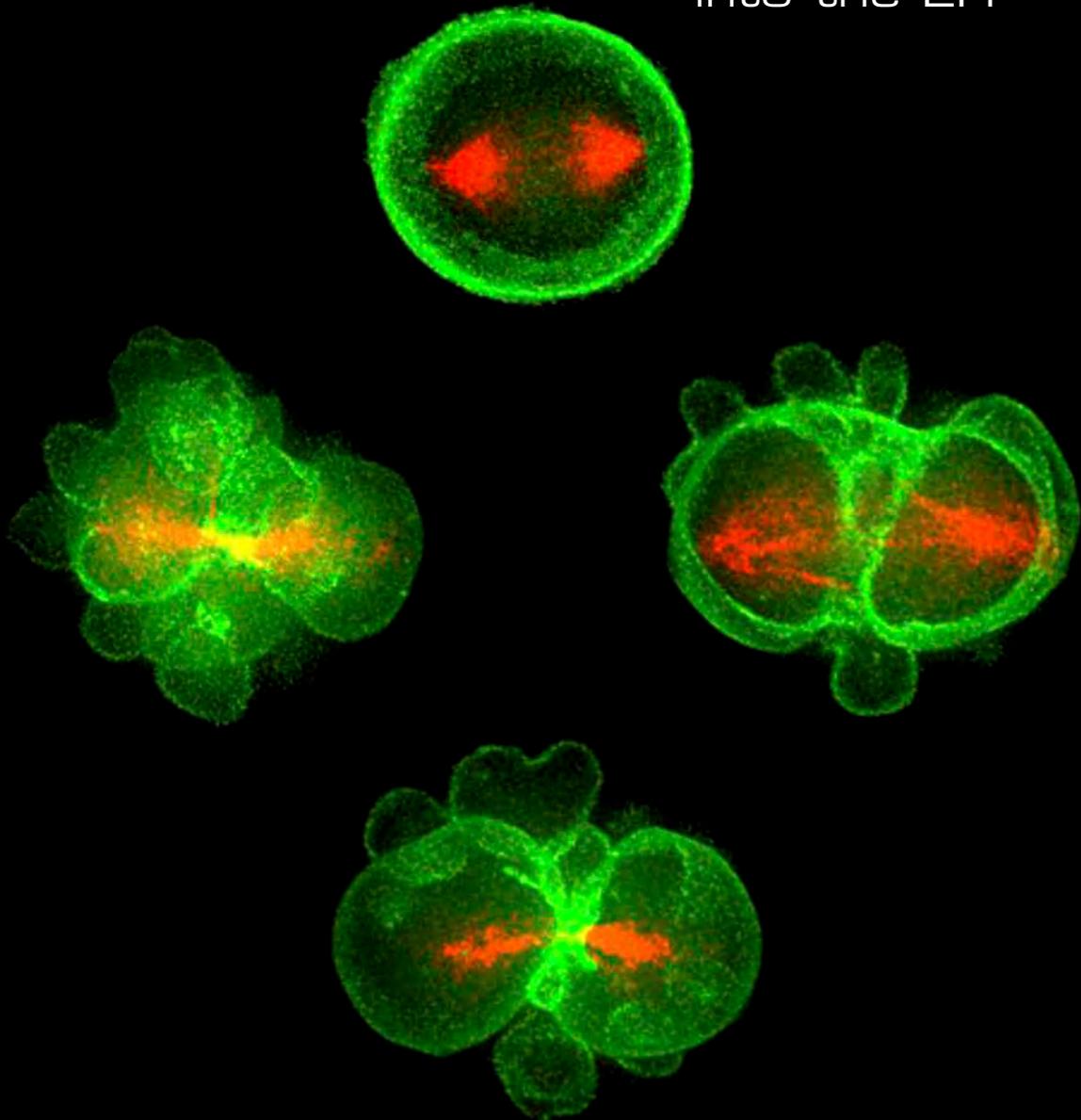
THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY

VOL. 195, NO. 1, OCTOBER 3, 2011

TPX2 Puts the Brakes
on Eg5

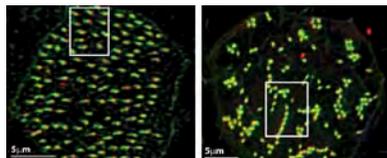
Actin and Microtubules
Keep Cilia in Line

Threading
Transmembrane Proteins
into the ER



Moesin Keeps Mitotic Cells in Shape

Fibers keep cilia regular



Cilia align in a control cell (left) but not in one with disrupted actin fibers (right).

the musicians in a garage band, each doing its own thing. But over time the filaments turn so that they all beat in the same direction. They also coordinate their timing, so that the cilia at the front of the cell beat first and the ones at the back of the cell stroke last. The planar cell polarity signaling pathway and hydrodynamic forces on the cilia help set up this polarity. Using the cilia-coated epithelial cells of *Xenopus* embryos,

Actin fibers and microtubules help cilia coordinate the direction and sequence of their beating, [Werner et al.](#) show.

At first, the multiple cilia on an embryonic cell are a bit like

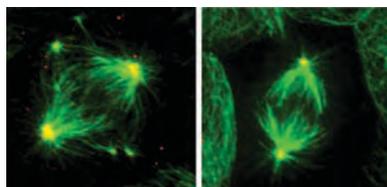
Werner et al. investigated the roles of the actin and microtubule cytoskeletons in the process.

Werner et al. observed actin fibers connecting neighboring cilia. These filaments were absent in the youngest cells that hadn't yet polarized. To determine the fibers' function, the researchers disassembled them using the drug cytochalasin D. Without actin fibers, the cilia couldn't reorient to beat in the same direction. They also couldn't coordinate their timing. However, neighboring clusters of cilia could still synchronize. This local coordination disappeared in cells lacking microtubules, the team found.

These results indicate that two components of the cytoskeleton perform different functions: actin fibers establish cell-wide coordination of cilia orientation and timing, whereas microtubules ensure that cilia are in harmony with their neighbors.

Werner, M.E., et al. 2011. *J. Cell Biol.* <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201106110>.

TPX2 is a drag on Eg5



Multiple spindle poles form in a cell that produces a version of TPX2 that can't interact with Eg5 (left), but a control cell shows a normal spindle (right).

Aurora A, a kinase necessary for spindle formation. TPX2 also latches onto the molecular motor Eg5, which crosslinks microtubules and pulls them past each other. Early in mitosis, Eg5 produces outward forces that push the spindle poles apart. Ma et al. wanted to determine how the interaction between TPX2 and Eg5 affects mitosis.

Putting the brakes on a molecular motor might help cells fashion the mitotic spindle, [Ma et al.](#) report.

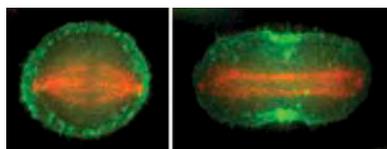
The protein TPX2 performs several jobs during spindle construction. For instance, it activates and positions

The researchers outfitted cells with a bacterial artificial chromosome encoding a version of TPX2 lacking the region that connects to Eg5. Then they used RNAi to deplete the cells' own version of TPX2. The cells made jumbled spindles with multiple poles and bowed microtubules. Thwarting the interaction between Eg5 and TPX2 caused another problem—the cells didn't make the kinetochore microtubules that attach to chromosomes and tug them apart.

Ma et al. found that TPX2 helps Eg5 to settle on the spindle microtubules between the poles. TPX2 also reduces the motor's ability to slide microtubules past one another in the spindle. The researchers hypothesize that, by idling the motor protein, TPX2 prevents it from generating too much outward force, which would lead to multiple poles or distorted fibers. One mystery, the researchers say, is how the interaction between TPX2 and Eg5 promotes stable connections between kinetochores and the spindle.

Ma, N., et al. 2011. *J. Cell Biol.* <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201106149>.

Mobile moesin helps mitotic cells stretch out



Moesin (green) initially disperses around the cortex of a mitotic cell (left) but then shifts to the cell's equator (right).

round up. During anaphase, the poles relax, and the cell equator contracts, allowing the cell to stretch and eventually split. Moesin, which belongs to a family of proteins that link the actin cytoskeleton to the plasma membrane, helps control the cell's shape. Roubinet et al. investigated what regulates the activity and location of moesin.

A mitotic cell reshapes itself twice. [Roubinet et al.](#) identify two molecular networks that help govern these transformations.

Early in mitosis, the cortex tightens, causing the cell to

Moesin's position reflects the cell's form, the researchers found. Until early anaphase, the protein is spread around the cortex, helping to keep the cell spherical. But then moesin begins to disappear from the poles and build up at the equator. Previous work showed that the enzyme Slik switches moesin on early in mitosis. Roubinet et al. discovered that the phosphatase Pp1-87B turns moesin off. Pp1-87B settles on segregating chromosomes during anaphase, which puts it in position to shut down moesin at the cell poles.

Two other enzymes, Pten and Skittles, boost the amounts of the phospholipid PI(4,5)P₂ at the cell's midsection, attracting moesin to that part of the cell. The researchers think that the two networks help ensure that moesin's activity surges all around the cortex before concentrating at the equator, allowing the cell to start out spherical and then to elongate and divide.

Roubinet, C., et al. 2011. *J. Cell Biol.* <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201106048>.

biosights free access

October 3, 2011: Moesin keeps mitotic cells in shape

biosights: October 3, 2011

Moesin keeps mitotic cells in shape

The Rockefeller University Press

biosights@rockefeller.edu

The ERM protein Moesin helps mitotic cells undergo a series of dramatic shape changes by linking the actin cytoskeleton to the plasma membrane. [Roubinet et al.](#) describe how Moesin's localization and activity is regulated over the course of the cell cycle by two different pathways that control Moesin phosphorylation and phosphoinositide synthesis. This biosights episode presents the paper by [Roubinet et al.](#) from the October 3, 2011, issue of *The Journal of Cell Biology*, and includes an interview with senior author Sébastien Carréno (University of Montreal, Canada). Produced by Caitlin Sedwick and Ben Short.

JCB Journal Club

THE ROCKEFELLER
UNIVERSITY
PRESS
QUALITY AND INTEGRITY

October 03, 2011

Control of mitotic shape transformations

The ERM protein Moesin helps mitotic cells undergo a series of dramatic shape changes by linking the actin cytoskeleton to the plasma membrane. [Roubinet et al.](#) describe how Moesin's localization and activity is regulated over the course of the cell cycle by two different pathways that control Moesin phosphorylation and phosphoinositide synthesis.

Download our Journal Club pack to aid your discussion of [Roubinet et al.](#)'s study, and its implications for cortical stability and cell shape changes during mitosis. The pack includes a complete pdf of the paper, a PowerPoint file of [Roubinet et al.](#)'s figures, supplementary videos, and the latest biosights video podcast, which features an interview with the study's senior author, Sébastien Carréno (University of Montreal, Canada).

INSTITUT DE RECHERCHE EN IMMUNOLOGIE ET EN CANCÉROLOGIE

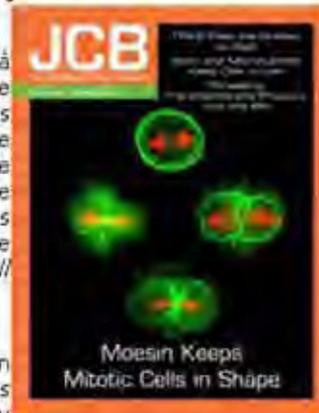
ACTUALITÉS

LE 28 OCTOBRE 2011

Garder les cellules en forme

Des chercheurs de l'IRIC font la couverture de la prestigieuse revue *The Journal of Cell Biology* avec une découverte récente sur la division cellulaire.

L'équipe du Dr Sébastien Carréno, chercheur principal à l'IRIC, et ses collaborateurs de l'Université Paul Sabatier de Toulouse en France, ont identifié deux mécanismes moléculaires responsables des changements dans la forme d'une cellule en division. Une meilleure compréhension de ce processus extrêmement complexe pourrait ouvrir de nouvelles avenues pour le développement de thérapies contre le cancer. La publication récente a fait la couverture de la prestigieuse revue scientifique *The Journal of Cell Biology* de l'édition du 3 octobre.



La division des cellules, aussi appelée mitose, est un processus étroitement contrôlé par l'organisme et les anomalies qui l'affectent sont souvent associées au développement et à la croissance d'une tumeur. Durant la mitose, la cellule change de forme de façon dramatique à au moins deux reprises. Au début de la division, le cortex de la cellule se resserre, forçant celle-ci à s'arrondir. Puis, vers la fin du processus, les pôles de la cellule relaxent et l'équateur se contracte permettant ainsi à la cellule de s'étirer puis de se scinder en deux.

La présente recherche s'est penchée sur une protéine appelée Moesine qui appartient à une famille de protéines qui lie la membrane de la cellule au cytosquelette du cortex, une armature de filaments située juste sous la surface, agissant ainsi comme des agrafes qui permettent de fixer la toile sur l'armature d'une tente pour en stabiliser la structure. Les chercheurs ont découvert que la position et l'activité de Moesine reflètent la forme de la cellule. En effet, durant la mitose, Moesine est initialement dispersée au pourtour de la cellule puis se concentre à l'équateur. De plus, les changements dans l'activité de Moesine orchestrent les changements de tension dans le cortex cellulaire qui sont en grande partie responsables des changements de la forme de la cellule.

Les chercheurs ont ensuite testé systématiquement tous les régulateurs potentiels de Moesine et ont identifié deux voies de contrôle de son activité. L'intégration des signaux de ces deux voies détermine la position et l'activité de Moesine et donc la forme de la cellule.

Ces observations sont des plus importantes dans l'étude du cancer car on sait que la surabondance d'une protéine de la même classe que Moesine a déjà été associée à la formation des métastases et donc au développement des cancers généralisés.

Étude citée

Roubinet C, Decelle B, Chicanne G, Dorn JF, Payrastra B, Payre F, Carreno S. (2011) *Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis.* **J Cell Biol.** 195:99-112.

Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis

Chantal Roubinet,^{1,4,5} Barbara Decelle,¹ Gaëtan Chicanne,^{6,7,8} Jonas F. Dorn,² Bernard Payrastré,^{6,7,8} François Payre,^{4,5} and Sébastien Carreno^{1,3}

¹Cell Biology of Mitosis laboratory and ²Mitotic Mechanisms and Chromosome Dynamics laboratory, Institute for Research and Immunology and Cancer, and ³Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire, Université de Montréal, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada

⁴Centre de Biologie du Développement, ⁵Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 5547, ⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1048, ⁷Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires, and ⁸Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, F-31062 Toulouse, Cedex 09, France

The cortical mechanisms that drive the series of mitotic cell shape transformations remain elusive. In this paper, we identify two novel networks that collectively control the dynamic reorganization of the mitotic cortex. We demonstrate that Moesin, an actin/membrane linker, integrates these two networks to synergize the cortical forces that drive mitotic cell shape transformations. We find that the Pp1-87B phosphatase restricts high Moesin activity to early mitosis and down-regulates Moesin at the polar cortex, after anaphase onset. Overactivation of

Moesin at the polar cortex impairs cell elongation and thus cytokinesis, whereas a transient recruitment of Moesin is required to retract polar blebs that allow cortical relaxation and dissipation of intracellular pressure. This fine balance of Moesin activity is further adjusted by Skittles and Pten, two enzymes that locally produce phosphoinositol 4,5-bisphosphate and thereby, regulate Moesin cortical association. These complementary pathways provide a spatiotemporal framework to explain how the cell cortex is remodeled throughout cell division.

Introduction

A universal feature of animal cells undergoing mitosis is the series of transformations in their shape necessary to generate two identical daughter cells. Mitotic cell shape remodeling relies on a precise coupling of cortical actomyosin forces with the plasma membrane. At mitosis entry, increased hydrostatic pressure and isotropic cortical contractility drive the characteristic rounding of prometaphase cells (Matzke et al., 2001; Maddox and Burridge, 2003; Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008; Stewart et al., 2011). Subsequently, asymmetry in cortical tensions leads to polar relaxation and equatorial contraction, which contribute to anaphase cell elongation and to cytokinesis (Hickson et al., 2006; Surcel et al., 2010; Sedzinski et al., 2011). Although mitotic stages were originally described more than one century ago (Flemming, 1882), the molecular networks that modify the cortex to drive transformations in the shape of dividing cells remain to be identified.

We and others have shown that Moesin (Moe) plays essential roles in the regulation of cell shape during mitosis in

Drosophila melanogaster (Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008). Moe is the sole *Drosophila* member of the ERM (Ezrin, Radixin, and Moesin) family of cytoskeletal regulators, which allow, in a signal-dependent manner, bridging of the actin cytoskeleton to the plasma membrane (Fehon et al., 2010). A flexible α -helical linker separates an N-terminal (FERM [4.1 and ERM]) domain from a C-terminal domain (C-ERMAD), which interact with the plasma membrane and with F-actin, respectively. ERM proteins are regulated by a conformational change: in their dormant cytoplasmic state, interaction between the FERM and the C-ERMAD domains masks the two binding surfaces. In response to various signals, ERM proteins open and provide a bridge between actin filaments and the plasma membrane. Activation of ERM proteins involves both the binding of the FERM domain to phosphoinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) and the phosphorylation of a conserved threonine residue (T559 in *Drosophila* Moe) located in the C-ERMAD moiety. Although phosphorylation is a hallmark of ERM activation,

Correspondence to Sébastien Carreno: sebastien.carreno@umontreal.ca

Abbreviations used in this paper: CH, calponin homology; dsRNA, double-strand RNA; mRFP, monomeric RFP; PH, pleckstrin homology; PI(4,5)P₂, phosphoinositol 4,5-bisphosphate; RC, rapamycin construct; sqh, spaghetti squash; UTR, untranslated region.

© 2011 Roubinet et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2011/09/29/jcb.201106048.DC1.html>
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2011/09/30/jcb.201106048.DC2.html>
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2011/09/30/jcb.201106048.DC3.html>

interaction with PI(4,5)P₂ has emerged as playing important roles in their regulation (Coscoy et al., 2002; Hao et al., 2009; Roch et al., 2010). Current models state that PI(4,5)P₂ favors conformational opening and that phosphorylation further stabilizes this open active form at the cell cortex (Fehon et al., 2010).

ERM function and proper regulation is required during cell division in both flies (Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008; Cheng et al., 2011) and mammals (Luxenburg et al., 2011). In *Drosophila*, depletion of Moe or Slik, the kinase necessary to phosphorylate Moe on T559, leads to similar mitotic defects: mutant cells are unable to round at mitosis entry, and their cortex is continuously deformed throughout cell division. Importantly, these cortical defects impinge on additional aspects of mitosis, including spindle morphogenesis and positioning, as well as chromosome segregation (Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008). Therefore, unraveling ERM function and regulation at the cortex represents a key step to better understanding how cell shape transformations are coordinated during division.

Using functional approaches and high-resolution live imaging in *Drosophila* cultured cells, we show here that the regulated activity of Moe orchestrates changes in tension applied at the cortex and thereby, controls cell shape transformations at the successive steps of cell division. Through systematic screenings of candidate regulators, we identify two networks that collectively provide a spatiotemporal control of Moe activity. The first one relies on Pp1-87B, a phosphatase that counteracts activity of the Slik kinase to restrict high Moe function to early mitosis. Then, the PI(4)P 5-kinase Skittles and PI(3,4,5)P₃ phosphatase Pten further refine the pattern of activated Moe through the local production of PI(4,5)P₂, which is required for both Moe cortical recruitment and phosphorylation. Integration of these two regulatory networks provides a cell cycle-regulated burst of isotropic Moe activation at the cortex, which is required for cell rounding at G2/M transition. Subsequently, the concomitant equatorial enrichment and polar diminution of Moe activity after the anaphase onset synchronizes equatorial contractions with polar relaxation to allow cell elongation and cytokinesis.

Results

Control of Moe activation participates in cell elongation and cytokinesis

As deduced from the pattern of phosphorylated Moe (P-Moe) in fixed samples (Carreno et al., 2008), the location of activated Moe parallels the sites of cortical contractions during mitosis. To gain insight into the role and the regulation of Moe activity at the cell cortex throughout the cell cycle, we examined dynamics of a functional GFP-tagged Moe (Roch et al., 2010) stably expressed in *Drosophila* S2 cells. Time-lapse microscopy confirmed that Moe localization is tightly regulated during the cell cycle. Although mostly cytoplasmic in interphase, Moe-GFP was recruited to the cell cortex upon mitosis entry (Fig. 1 A). Then, it was redistributed into the cytoplasm after furrow ingression, before complete abscission. Throughout mitosis, the spatial pattern of Moe association with the cortex directly correlated

with cell morphology. In prophase, metaphase, and early anaphase, when cells are spherical, Moe-GFP was isotropically associated with the cortex. When cells started to elongate in anaphase B, Moe-GFP was progressively lost from the poles and accumulated at the equator (Fig. 1, B and C; and [Video 1](#)).

This dynamic Moe localization likely requires precise regulation of its activity. We tested this hypothesis by substituting endogenous Moe with a constitutively active phosphomimetic mutant, Moe-TD-GFP. To this aim, cells stably expressing Moe-TD-GFP were treated by a double-strand RNA (dsRNA) specifically targeting the 3' untranslated region (UTR) of endogenous Moe RNA. Under these conditions, hereafter referred to as Moe-TD cells, Moe-TD-GFP accumulated abnormally at the cortex in interphase and remained associated with the polar cortex during cell elongation (Fig. 1, D, F, and G). Although Moe depletion triggered a low rate of cytokinesis failure (Carreno et al., 2008), substituting endogenous Moe by Moe-TD-GFP impaired cytokinesis in 50% of the cells (Fig. 1 E). Because in many cell types completion of cytokinesis relies on proper elongation in anaphase B (Rappaport, 1971), we evaluated the geometry of Moe-TD cells when progressing through anaphase. Indeed, most Moe-TD cells displayed defective elongation, a phenotype associated to cytokinesis failure (Fig. 1 E). It has been shown that anaphase cell elongation requires concomitant equatorial actomyosin contractions and polar relaxation (Hickson et al., 2006). Because activated Moe increases cortical rigidity (Kunda et al., 2008), we hypothesized that Moe overactivation at the polar cortex triggers excessive stiffness by increasing F-actin association and, consequently, blocks cell elongation. Consistently, we measured an increase in F-actin associated with the polar cortex versus the equatorial region in Moe-TD cells (Fig. 1 H). These results indicate that reduction of Moe activity at the polar cortex contributes to cell elongation during anaphase B and thus, to cytokinesis.

Moe controls polar relaxation by regulating polar cortical blebbing

To further investigate the role of Moe in anaphase cell elongation, we imaged cortical dynamics in dividing S2 cells. Since pioneering works (Prothero and Spencer, 1968), several studies have shown that short-lived blebs form at each pole during anaphase elongation (Porter et al., 1973; Fishkind et al., 1991; Burton and Taylor, 1997; Boucrot and Kirchhausen, 2007). These polar blebs have been recently shown to be necessary to release the cortical tension and cytoplasmic pressure created by cytokinetic ring furrowing (Sedzinski et al., 2011). High-resolution analyses of living Moe-GFP cells indicated that Moe was not initially associated with the bleb cortex during its expansion and was recruited at the bleb rim just before retraction. In normal conditions, blebs were rapidly retracted, within a couple of minutes (Figs. 2 A and [S1](#) and [Video 2](#)), and thus, displayed a small size (Fig. 2 B). The absence of Moe activity leads to abnormally large cytoplasmic bulges deforming the cortex of dividing cells as observed in fixed samples (Carreno et al., 2008), suggesting that it disrupts cortical organization. We thus analyzed Moe-GFP dynamics in living cells during polar blebbing

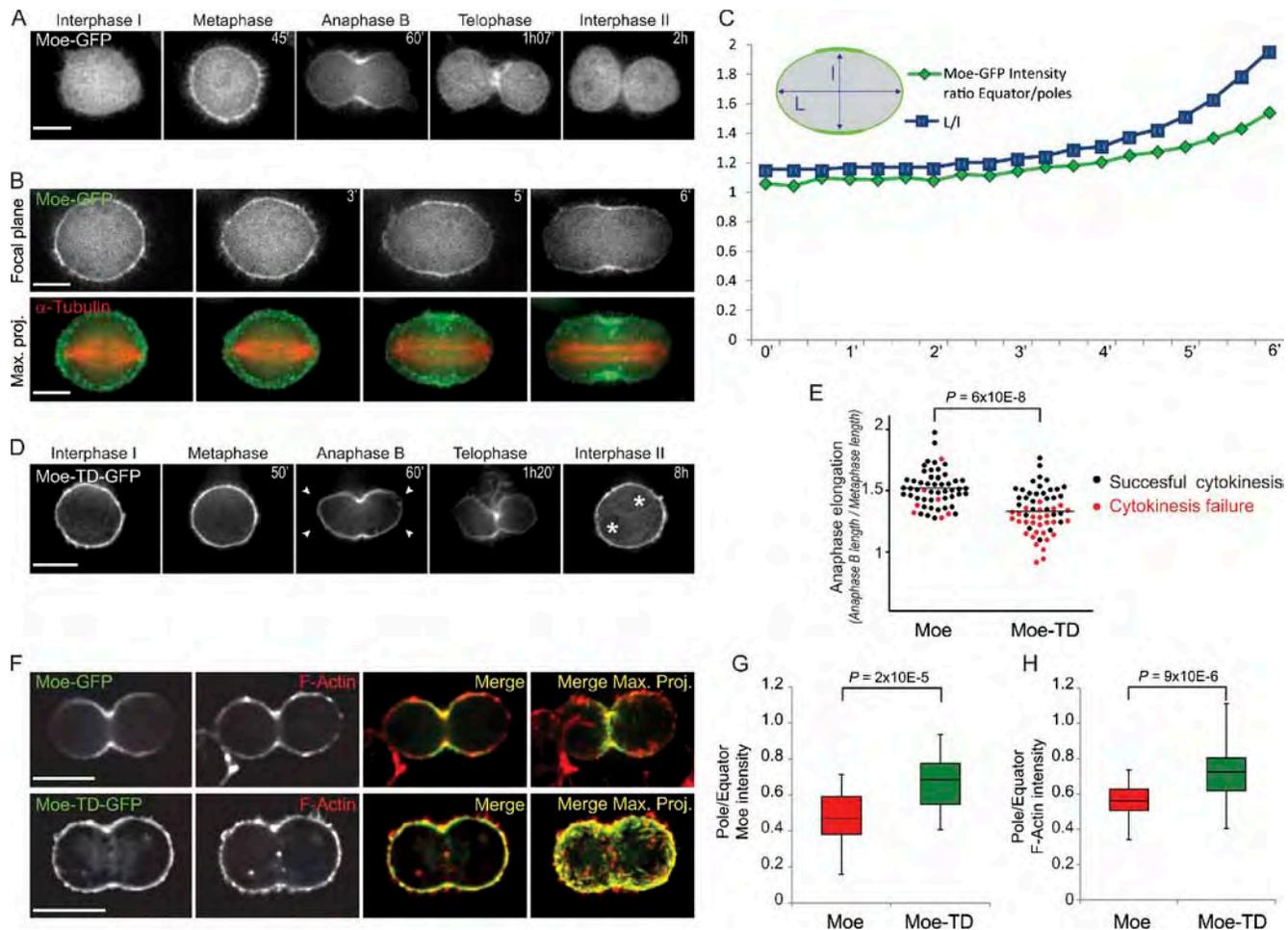


Figure 1. **Control of Moe activation contributes to cell elongation and cytokinesis.** (A) Time lapse of Moe distribution throughout the cell cycle observed in a stable S2 cell line coexpressing Moe-GFP (white) and α -Tubulin-mCherry (not depicted). (B) Dynamics of Moe-GFP during anaphase cell elongation. Top images show a single focal plane of Moe-GFP, and bottom images show maximum projections of Moe-GFP and α -Tubulin-mCherry. (C) Quantification of the equatorial enrichment of Moe-GFP (green) during anaphase elongation (blue) measured as the ratio between cell length along the spindle (L) versus the equator (I). (D) Dynamics of Moe-TD-GFP as observed in living cells upon depletion of endogenous Moe. Moe-TD-GFP remained associated with the polar cortex in anaphase (arrowheads) and caused binucleation (asterisks point to nuclei). (E) Distribution of the maximal elongation of individual Moe-GFP or Moe-TD-GFP cells (cell length in anaphase B/cell length in metaphase). Black dots represent cells that successfully passed through division, and red dots indicate cytokinesis failure. Bars represent mean values for each condition. (F) F-actin distribution in cells expressing Moe-GFP or Moe-TD-GFP upon depletion of endogenous Moe. The right-most images show maximum projection (Max. Proj.). (G and H) Polar enrichment of Moe (G) and F-actin (H) in cells expressing Moe-GFP or Moe-TD-GFP in the absence of endogenous Moe. Boxes show top and bottom quartiles, horizontal lines show median values, and vertical lines show minimal and maximal values. Bars, 10 μ m.

and anaphase relaxation in the absence of Slik kinase to preclude Moe activation. Slik depletion decreased the cortical association of Moe-GFP and prevented its recruitment to the bleb cortex (Fig. 2 A and Video 3). Furthermore, similarly to Moe depletion, disrupting Moe activation through Slik knockdown promoted unregulated growth of blebs as well as their delayed retraction, leading to an apparently exaggerated relaxation of the anaphase cortex (Figs. 2 B and S1).

To further explore how Moe controls normal blebbing during polar relaxation in anaphase, we imaged the actomyosin cortex using stable cell lines that express the calponin homology (CH) domain of Utrophin fused to GFP to probe actin (Burkel et al., 2007) or the myosin regulatory light chain spaghetti squash (sqh)-GFP to visualize activated myosin (Rogers et al., 2004). In control cells, actin and myosin show similar dynamic association with the bleb cortex. Although they were

not associated with bleb membranes when blebs expand, they were recruited to the bleb cortex when they retract in a manner that parallels the recruitment of Moe (Figs. 2 C and S1 and Video 4). In cells depleted of Moe or Slik, actin and myosin were no longer recruited uniformly to the bleb cortex (Figs. 2 C and S1 and Video 5). Secondary blebs then formed, ultimately leading to multiple blebs on blebs and triggering the abnormal mitotic cytoplasmic bulges observed in fixed samples (Carreno et al., 2008).

Together, these results show that cell division involves a precise regulation of Moe activity to control polar relaxation via mitotic blebbing. Defective Moe cortical recruitment promotes abnormal, unregulated polar blebs and thus, excessive polar relaxation. On the contrary, overactivation of Moe at the polar cortex impairs anaphase relaxation and cell elongation, leading to cytokinesis failure.

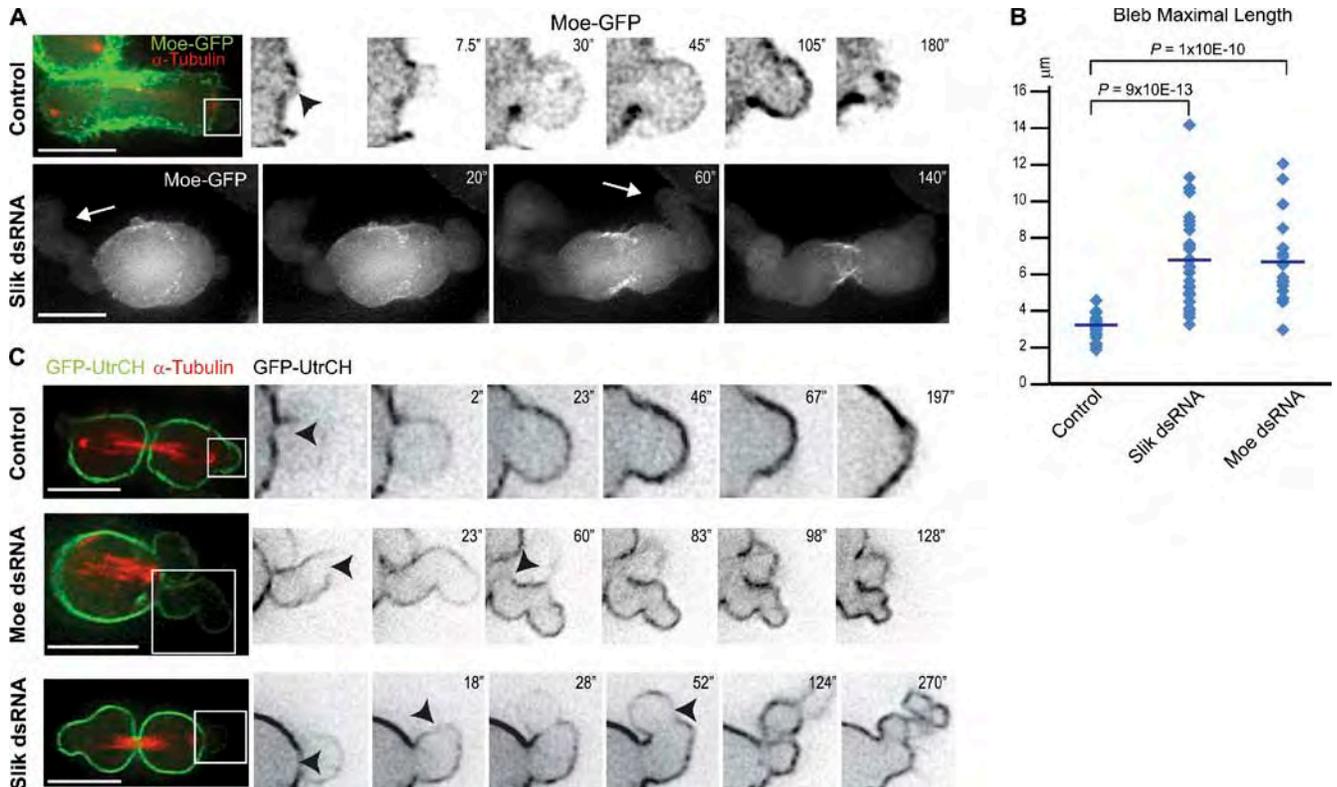


Figure 2. **Moe controls polar relaxation and retraction of short-lived blebs.** (A) Rapid time-lapse imaging of a cell line coexpressing Moe-GFP and α -Tubulin-mCherry in control condition (top) and after Slik depletion (bottom). The merge image shows maximum projection and close-up single focal planes from the boxed region; Moe-GFP is shown in black. Arrowhead shows an apparent cortical rupture at the site of bleb formation, and arrows point to unregulated blebs. (B) Individual blebs were plotted according to their maximal length in controls cells and after Slik or Moe dsRNA depletion. Bars represent mean values for each condition. (C) Rapid time-lapse imaging of a GFP-UtrCH (α -Tubulin-mCherry cell line in control conditions (top) and after Moe or Slik depletion. Close-ups correspond to the framed region and show the GFP signal in black. Arrowheads show cortical actin rupture and F-actin defective recruitment to the bleb membrane. Bars, 10 μ m.

Pp1-87B phosphatase controls Moe inactivation

Having shown that the anisotropic distribution of Moe in anaphase contributes to proper cell division, we then sought to identify regulators of Moe activity. Although Moe activation relies on the activity of Slik kinase (Figs. 3, A and B; and S2 A; Hipfner et al., 2004; Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008), treatment with calyculin A (a PP1 and PP2A phosphatase inhibitor) increased Moe phosphorylation (Fig. 3 A), revealing the existence of a counteracting phosphatase activity.

To identify the phosphatase that inactivates Moe, we individually knocked down each of the *Drosophila* PP1 and PP2A catalytic subunits (Chen et al., 2007) and examined levels of P-Moe by Western blotting. We found that the depletion of Pp1-87B increased Moe phosphorylation (Fig. 3 A). To further identify at which stage of the cell cycle Pp1-87B inactivates Moe, we assessed P-Moe levels by immunofluorescence. We observed that Pp1-87B depletion promoted a threefold increase in Moe phosphorylation at the cortex in interphase (Figs. 3 B and S2 A). Nevertheless, Pp1-87B depletion did not increase P-Moe levels in metaphase, suggesting that Pp1-87B acts to down-regulate Moe at the cortex in interphase. Accordingly, time-lapse analyses showed that after cell division, Moe-GFP was abnormally associated with the cortex of interphase Pp1-87B-depleted cells (Fig. 3 C). In addition, Moe-GFP stayed also aberrantly

associated with the polar cortex during anaphase elongation in Pp1-87B-depleted cells, similar to the distribution of the phosphomimetic Moe-TD mutant form (Fig. 1 D). As observed in Moe-TD cells, Pp1-87B depletion triggered frequent cytokinesis failure (21%, $n = 554$), further supporting that Moe down-regulation at the polar cortex is required to achieve proper cell division.

To evaluate how Pp1-87B controls Moe activity during the cell cycle, we examined Pp1-87B distribution using a functional GFP fusion (Fig. S2 C). Although mostly cytoplasmic in interphase, GFP-Pp1-87B was redistributed to the mitotic spindle upon mitosis entry (Figs. 3 D and S2 D). Similarly to Pp1- γ , its human orthologue (Trinkle-Mulcahy et al., 2006), GFP-Pp1-87B accumulated on chromosomes, close to the polar cortex in anaphase (Figs. 3 D and S2 D); then, it concentrated to the intercellular bridge where Moe is normally inactivated before abscission (Fig. 1 A). Therefore, dynamics of Pp1-87B distribution inversely correlates with sites of Moe activity. In contrast, Slik associated with the whole-cell cortex in interphase and metaphase and accumulated at the cleavage furrow after the anaphase onset (Fig. 3 D). These data show that a balance of Slik kinase and Pp1-87B phosphatase activities coordinates Moe activation with the cell cycle, restricting high levels of active cortical Moe to early mitosis.

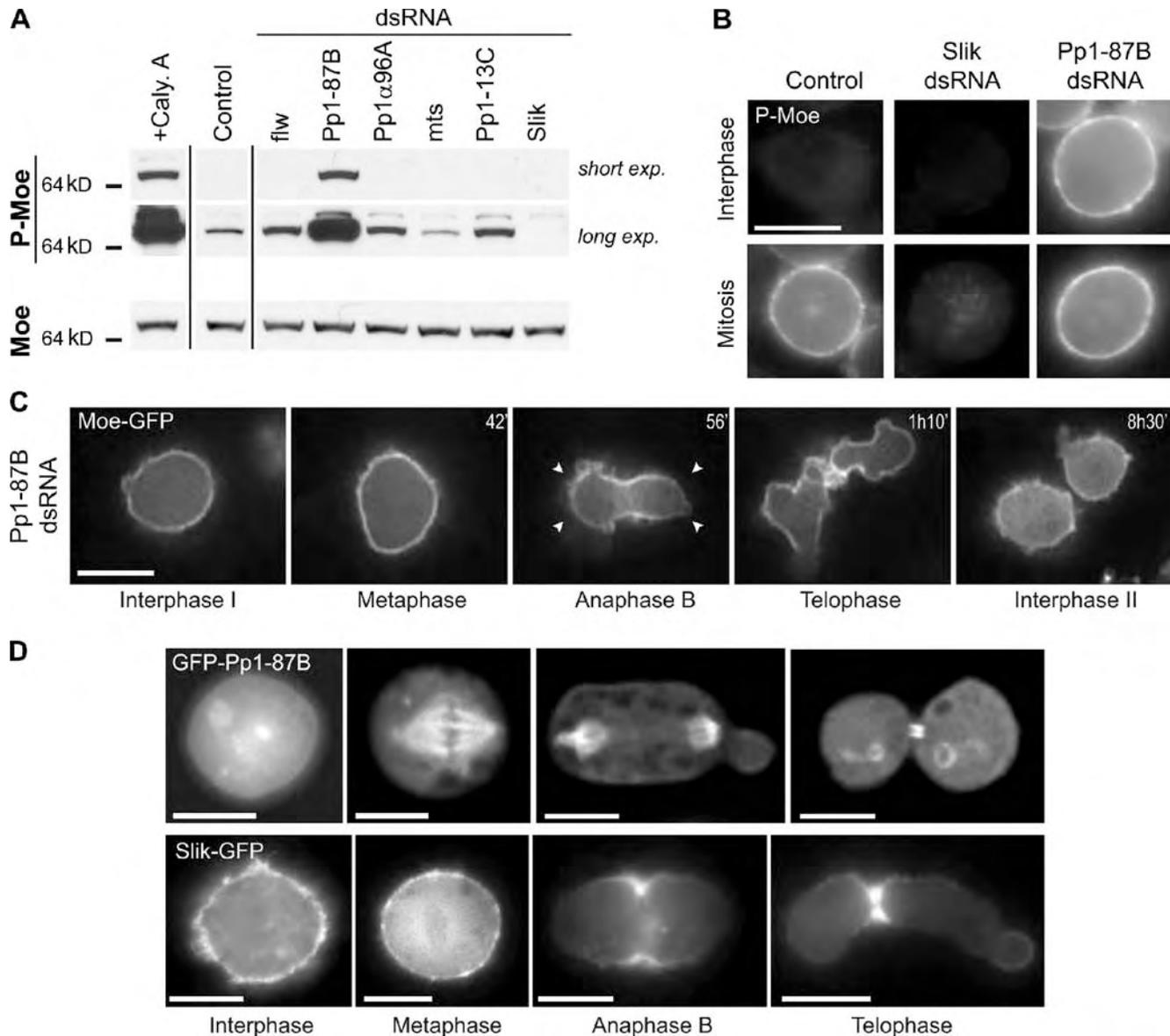


Figure 3. The Pp1-87B phosphatase down-regulates Moe activation. (A) Protein extracts from S2 cells treated with Calyculin A (Caly. A) or dsRNAs targeting Slik and the catalytic subunits of each *Drosophila* PP1 and PP2A phosphatases were analyzed by Western blotting using antibodies against Moe (bottom) or specific for T559-phosphorylated Moe (P-Moe; top). The same blot is shown at two different expositions (exp.) for P-Moe. flw, Flapwing; mts, Microtubule star. (B) Immunodetection of P-Moe in control S2 cells or after depletion of Slik or Pp1-87B. (C) Dynamics of Moe-GFP during the cell cycle after depletion of Pp1-87B. Arrowheads show persistence of the association of Moe-GFP with the polar cortex. (D) Distribution of GFP-Pp1-87B (top) and Slik-GFP (bottom). Division stages were identified with α -Tubulin-mCherry (not depicted). Bars, 10 μ m.

PI(4,5)P₂ regulates Moe distribution during mitosis

Despite alteration of Moe cortical levels, neither Slik nor Pp1-87B depletion completely abolished the equatorial enrichment of Moe-GFP when cells progress through anaphase (Figs. 2 A and 3 C). Furthermore, the reciprocal phospho mutant forms of Moe, Moe-TD-GFP (Fig. 1 D) and Moe-TA-GFP (Fig. S3), remained enriched at the equatorial cortex in anaphase. These findings suggest that a phosphorylation-independent mechanism regulates the cortical distribution of Moe after the anaphase onset. Binding of the FERM domain to PI(4,5)P₂ plays a key role in Moe function in vivo (Roch et al., 2010), opening the possibility that PI(4,5)P₂ could contribute to the regulation of Moe activity/distribution during cell division.

As a first test of this hypothesis, we examined the distribution of the Moe FERM domain fused to GFP (FERM^{Moe}-GFP) in live cells. Although FERM^{Moe}-GFP isotropically associated with the cortex from interphase to metaphase, it was then enriched at the equatorial cortex in anaphase B and telophase (Fig. 4 A). Reciprocally, a full-length Moe mutant (Moe-KN-GFP) unable to bind to PI(4,5)P₂ (Roch et al., 2010) was not associated with the cortex throughout mitosis (Fig. 4 A). Therefore, PI(4,5)P₂ binding is required for Moe enrichment at the anaphase equator.

We then examined the localization of PI(4,5)P₂ in a S2 cell line that stably expresses GFP-Tubby, a specific probe for this phosphoinositide (Szentpetery et al., 2009; Ben El Kadhi et al., 2011). As observed for Moe-GFP (and FERM^{Moe}-GFP), GFP-Tubby cleared from polar regions and concentrated at the

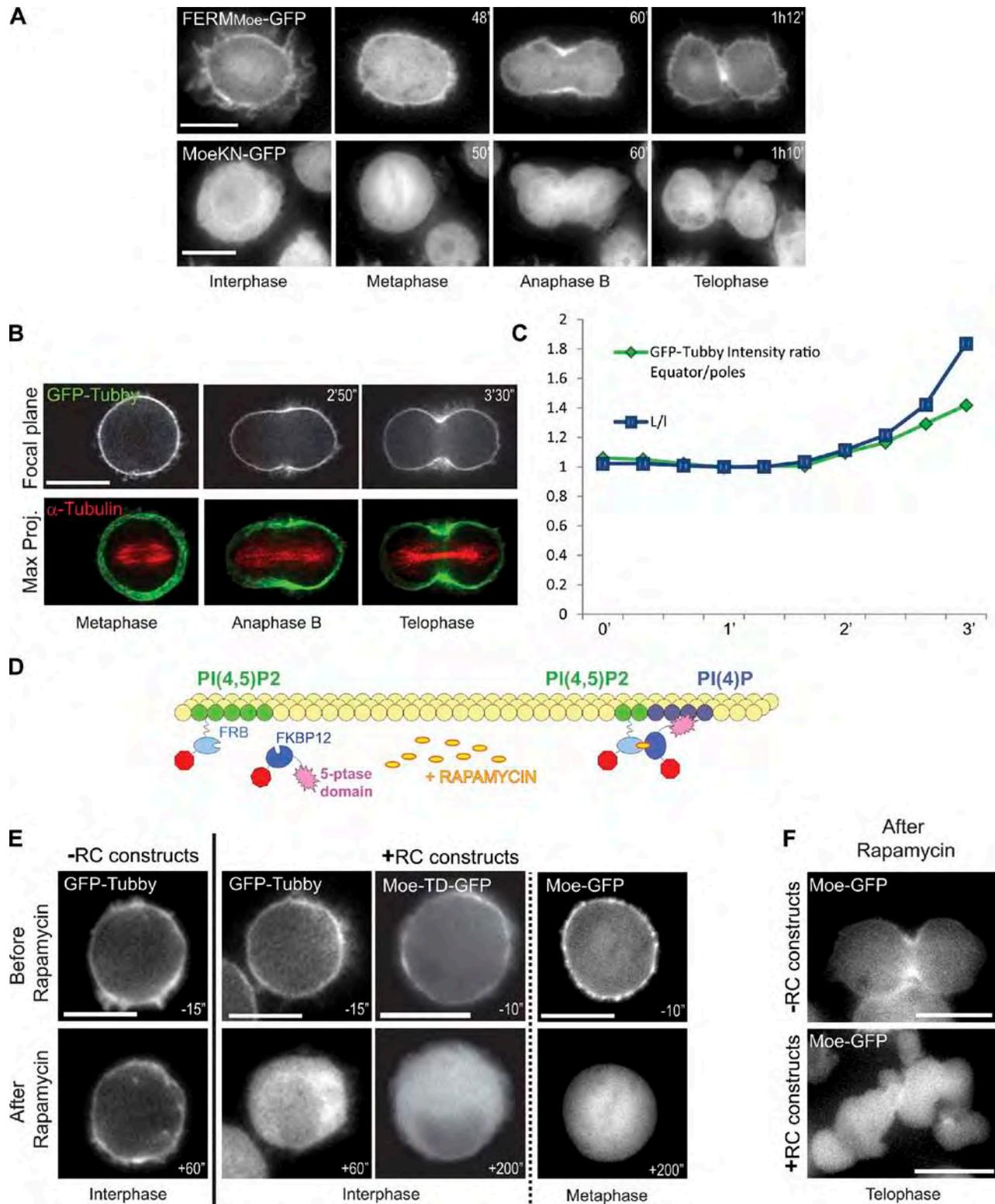


Figure 4. PI(4,5)P₂ regulates Moe distribution during mitosis. (A) Time-lapse frames of cells stably expressing the N-terminal FERM domain of Moe fused to GFP (top) or a full-length mutant form of Moe (Moe-KN-GFP; bottom) at which point mutations in the FERM domain abolish binding to PI(4,5)P₂ (Roch et al., 2010). (B) Dynamics of GFP-Tubby, a PI(4,5)P₂ probe in a living S2 cell undergoing mitosis. Max Proj., maximum projection. (C) Quantification of the equatorial enrichment of GFP-Tubby (green) and of anaphase cell elongation (blue). L, length along the spindle; I, length along the equator. (D) Schematic representation of rapamycin-induced dephosphorylation of PI(4,5)P₂. Protein domains expressed from RC constructs heterodimerize upon rapamycin addition causing dephosphorylation of PI(4,5)P₂ at the plasma membrane (Varnai et al., 2006). (E) Cell lines stably expressing GFP-Tubby, Moe-GFP, or Moe-TD-GFP were transfected (+RC) or not transfected (-RC) by RCs. Living interphase or metaphase cells were imaged just before and after rapamycin addition. (F) Rapamycin-treated Moe-GFP cells in telophase expressing (+RC) or not expressing (-RC) RC constructs. Bars, 10 μ m.

equator when cells started to elongate in anaphase (Fig. 4, B and C). These results support the idea that PI(4,5)P₂ contributes to the local control of Moe activation during cell division.

To directly test this conclusion, we used a system that rapidly reduces PI(4,5)P₂ cortical levels (Varnai et al., 2006), through a rapamycin-inducible recruitment of a type IV phosphoinositide 5-phosphatase domain to the plasma membrane (Fig. 4 D). In this assay, rapamycin induces the heterodimerization between a membrane-targeted FKBP-rapamycin-binding domain fragment of mammalian target of rapamycin and a 5-phosphatase domain fused to FKBP12 (Varnai et al., 2006), individually expressed from two constructs, hereafter referred to as rapamycin constructs (RCs). Although addition of rapamycin to control cells did not modify the localization of GFP-Tubby (Figs. 4 E and S4 A), rapamycin promoted its rapid translocation from the membrane to the cytosol in RC cells (Figs. 4 E and S4 B [for quantification] and Video 6). These results validate the efficiency of the RC system in S2 cells and the specificity of the GFP-Tubby probe for PI(4,5)P₂. We then explored whether reduction of PI(4,5)P₂ affects the distribution of wild-type or TD Moe-GFP. Moe-TD displayed a strong cortical association in interphase, which was lost after rapamycin treatment in RC cells (Fig. 4 E). Furthermore, when rapamycin was added on RC cells in metaphase, Moe-GFP rapidly delocalized from the cortex to the cytoplasm (Figs. 4 E and S4 C [for quantification] and Video 7). Similarly to Moe dsRNA depletion, this rapamycin-inducible release of Moe from cortical membranes triggered excessive polar relaxation, with unregulated blebbing during cell elongation (Fig. 4 F and Video 8). Together, these results support that PI(4,5)P₂ is necessary to ensure mitotic cortical stability, at least in part, through regulation of Moe cortical distribution and activation.

Localized activity of Skittles and Pten controls sites of PI(4,5)P₂ production and of Moe activation

To further investigate how PI(4,5)P₂ regulates mitotic cortical stability and Moe activation, we individually depleted each of the *Drosophila* kinases (10), phosphatases (16), and phospholipases (5) predicted to directly or indirectly control PI(4,5)P₂ metabolism (Figs. 5 A and S5), and we assessed the consequences of these depletions on the mitotic cortex by time-lapse microscopy. Among the 31 enzymes we have tested, depletion of three proteins induced high cortical defects, including excessive polar relaxation and unregulated blebs during anaphase (Figs. 5 B and S5). Two of them, Skittles and Pten directly produce PI(4,5)P₂ by phosphorylating PI(4)P and dephosphorylating PI(3,4,5)P₃, respectively. The third enzyme, encoded by CG10260 and predicted to produce PI(4)P from phosphatidylinositol, was required to a lesser extent for mitotic cortical stability (Fig. 5 B). To quantify the respective contribution of these enzymes to PI(4,5)P₂ production, we measured cellular phosphoinositides using radiolabeling assays (Payrastra, 2004). PI(4,5)P₂ pools were decreased by 15, 31, and 48% after depletion of CG10260, Pten, or Skittles, respectively (Fig. 5 C). Consistently, although the cortical association of GFP-Tubby was only slightly reduced by depletion of CG10260 (not depicted),

the absence of Pten or Skittles further prevented the cortical recruitment of this biosensor, showing that these enzymes generate PI(4,5)P₂ at the cortex (Fig. 5 D).

Having shown that Skittles and Pten play major roles in PI(4,5)P₂ production in S2 cells, we first examined whether their localization could account for PI(4,5)P₂ enrichment at the equator in anaphase. Comparable with PI(4,5)P₂ dynamics, Pten-GFP and Skittles-GFP uniformly associated with the cortex in prometaphase. Both enzymes then progressively accumulated at the equator, as cells underwent anaphase elongation (Fig. 6, A and B). Because Pten metabolizes PI(3,4,5)P₃, we analyzed the distribution of this PI(4,5)P₂ precursor during cell division using the Grp1-pleckstrin homology (PH)-GFP-specific PI(3,4,5)P₃ probe (Gray et al., 1999). In control cells, Grp1-PH-GFP was weakly associated with the cortex of mitotic cells, albeit enriched at the cleavage furrow in anaphase (Fig. 6 A). Pten depletion increased the cortical levels of Grp1-PH-GFP, with accumulation at the anaphase equator, where Pten normally localizes. This indicates that Pten locally dephosphorylates PI(3,4,5)P₃ to control PI(4,5)P₂ cortical levels during mitosis. Accordingly, depletion of Pten provoked the formation of abnormal long-lived polar blebs, a phenotype reminiscent of that seen after rapamycin-induced reduction of PI(4,5)P₂. The absence of Skittles further decreased cortical PI(4,5)P₂ levels during mitosis, as deduced from its impact on GFP-Tubby distribution (Fig. 6 B). The depletion of Skittles also enhanced unregulated polar blebbing in anaphase (Fig. 6 B), mimicking the defects observed in cells with reduced PI(4,5)P₂ levels by the RC experiment (Fig. 4 F) or those lacking Moe activity (Fig. 2, A and C).

We then tested whether Skittles or Pten was required for Moe phosphorylation during mitosis, using FACS analysis of cells costained for P-Moe and the mitotic marker phospho-histone H3. When compared with control conditions, Pten depletion caused a slight decrease in P-Moe levels (27.7% of mitotic cells negative for P-Moe staining vs. 17% in controls). These defects were enhanced when Skittles was depleted, with 81.7% of mitotic cells displaying reduced levels of Moe phosphorylation (Fig. 6 C).

Accordingly, Skittles depletion impaired the association of Moe-GFP with the mitotic cortex (compare Fig. 6 D and Video 9 with Fig. 1 A). This lack of Moe recruitment at the cortex of polar blebs correlated with defects in actin organization (Fig. 6 E and Video 10) and triggered the “blebs on blebs” phenotype and unregulated bleb growth (5.57 ± 1.58 - μm length, $n = 26$ vs. 3.25 ± 0.44 - μm length, $n = 40$ in controls; $P = 1.5 \times 10^{-8}$) observed after Moe or Slik depletion (Fig. 2, A and C).

These results show that Skittles and Pten contribute to enrich PI(4,5)P₂ at the equator, when dividing cells progress through anaphase. Thus, Skittles and Pten spatially mediate Moe cortical activation to promote efficient bleb dynamics necessary to control anaphase cell elongation.

Discussion

These findings unravel how, by integrating two regulatory networks, Moe activity provides a spatiotemporal framework to control cell shape transformations during division (Fig. 7).

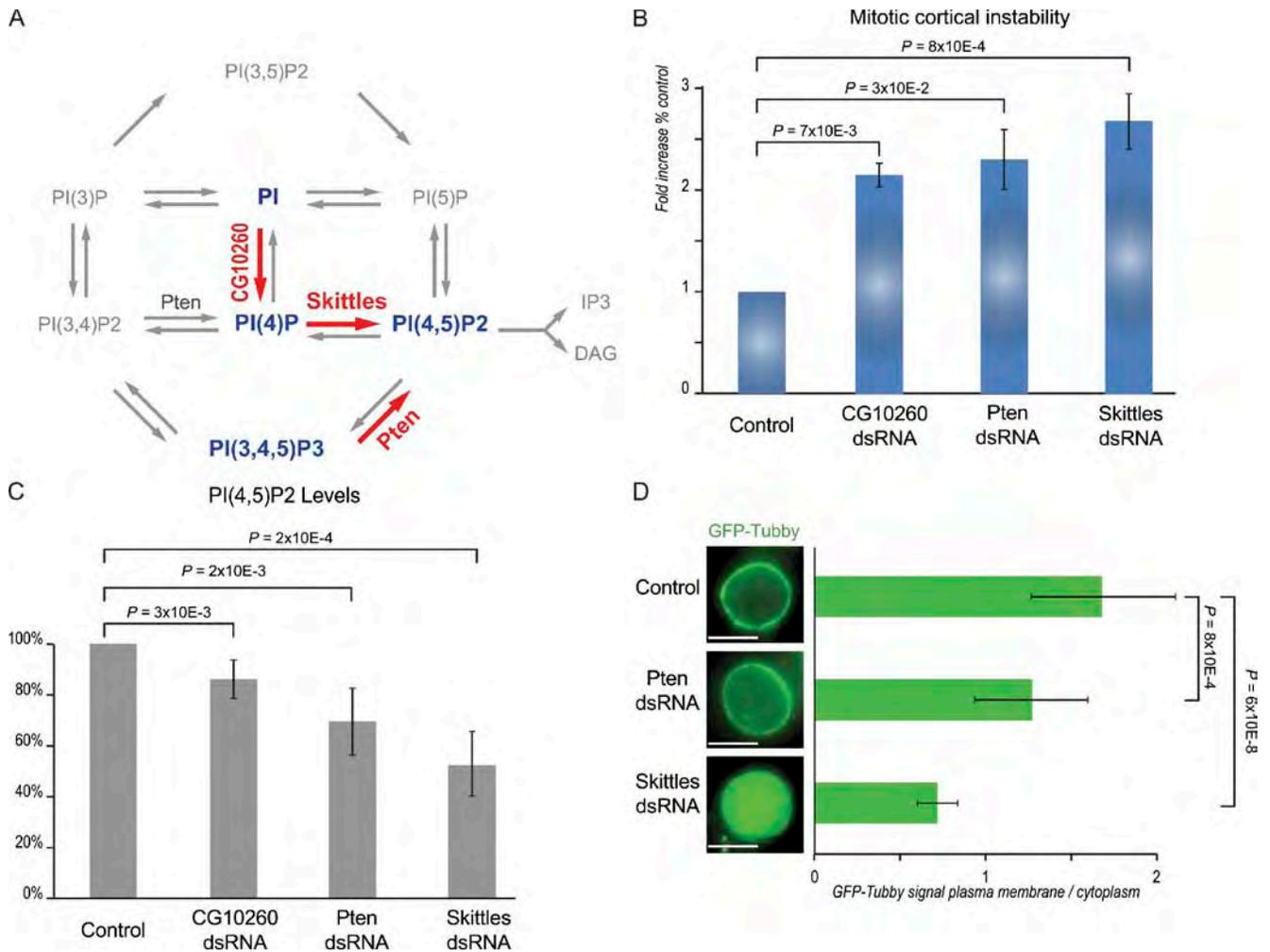


Figure 5. **Depletion of Skittles and Pten destabilizes the mitotic cortex.** (A) Schematic representation of phosphoinositide (PI) pathways. Each of 31 enzymes was individually inactivated by dsRNA, and its influence on cortical stability was analyzed by time-lapse imaging of α -Tubulin-GFP cells undergoing mitosis ($n > 100$ cells per condition). (B) The graph plots the percentage of cells with mitotic blebbing in control condition and after inhibition of CG10260, Pten, or Skittles. (C) Cellular levels of PI(4,5)P₂ in controls and in cells after depletion of CG10260, Pten, or Skittles, as measured by biochemical assays. An arbitrary value of 1 was attributed to levels observed in wild-type cells. (D) Influence of Pten and Skittles on PI(4,5)P₂ levels at the cortex of S2 cells. Pictures show GFP-Tubby cells in control conditions and after Pten or Skittles depletion. The graph plots the percentage of cells showing membrane association of GFP-Tubby in each condition. Error bars represent SD. Bars, 10 μ m.

We find that the increase in cortical rigidity that drives cell shape remodeling at the interphase/mitosis transition involves a Pp1-87B/Slik molecular switch that timely regulates Moe phosphorylation. We further identify PI(4,5)P₂ as a spatial cue that controls Moe distribution at the cortex. This latter aspect coordinates the spatial balance in cortical stiffness/contractility that is required for anaphase cell elongation and cytokinesis. We propose that the concerted action of these two regulatory networks ensures the proper series of mitotic cell shape transformations required for the fidelity of cell division (Fig. 7).

A Pp1-87B/Slik molecular switch controls temporal activation of Moe

A global increase in cortical actomyosin forces generate cell rounding at mitosis entry (Maddox and Burrige, 2003; Stewart et al., 2011). These forces are transmitted to the plasma membrane through the activation of ERM proteins (Carreno et al., 2008;

Kunda et al., 2008; Luxenburg et al., 2011). At mitosis exit, both cortical contractions and ERM activity must be down-regulated to allow cells to go back to their interphase shape. In *Drosophila* cells, the Slik kinase was shown to activate Moe at mitosis entry (Carreno et al., 2008; Kunda et al., 2008). Here, we identify the Pp1-87B phosphatase as essential for Moe inactivation after cytokinesis and in interphase.

Although Slik homogeneously associates with the cell cortex in both interphase and early mitosis, Pp1-87B is cytoplasmic in interphase and relocates to the spindle in pro/metaphase (Fig. 7 B). An attractive model would be that together with a “constitutive” cortical association of the Slik activator in interphase and pro/metaphase, intracellular redistribution of the Pp1-87B inhibitor represents an efficient way to restrict high levels of Moe phosphorylation to mitosis entry. During anaphase, Pp1-87B concentrates near the chromosomes migrating toward the polar cortex, whereas Slik accumulates at the cleavage furrow. In this model, redistribution of both Pp1-87B

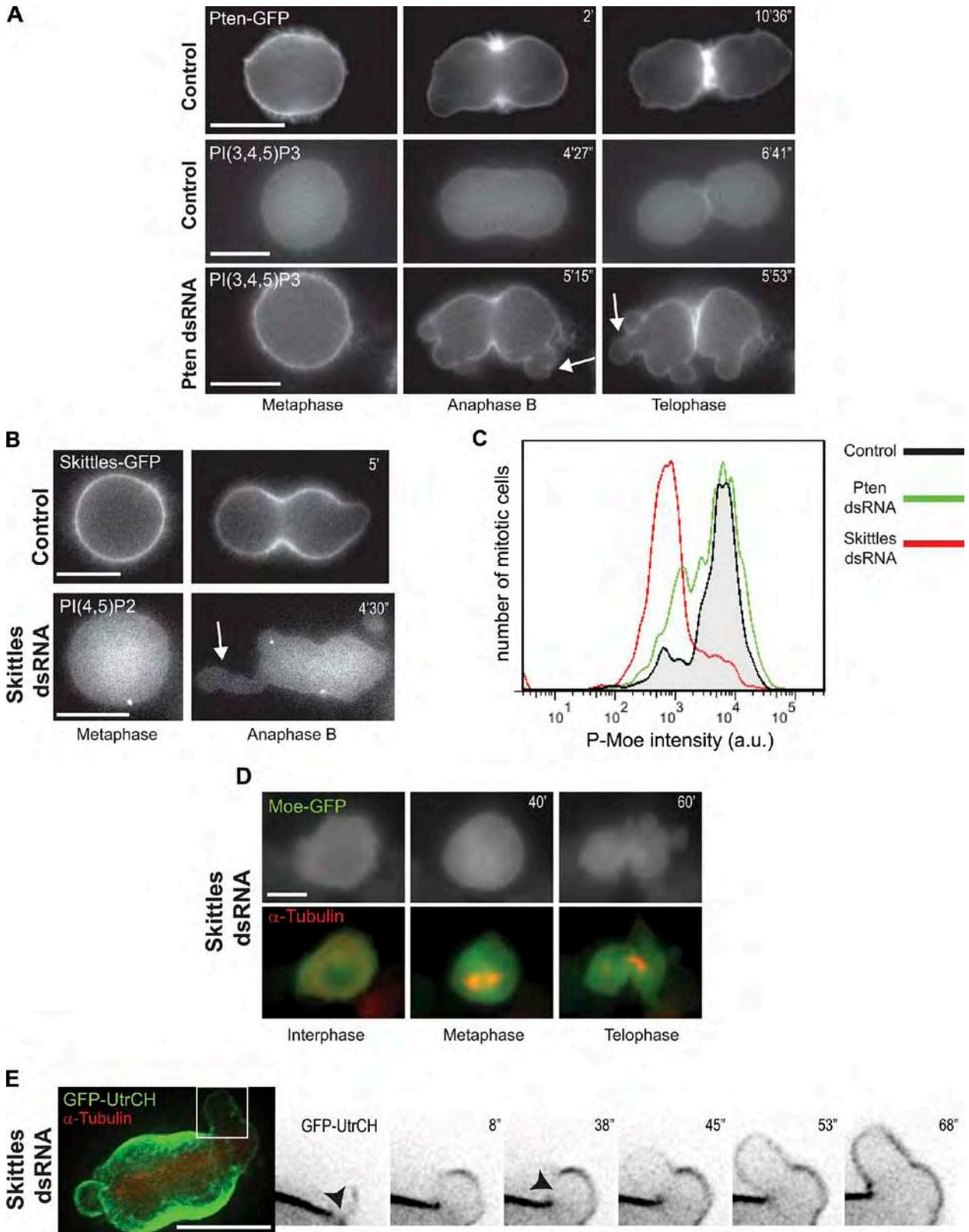


Figure 6. Localized activity of Skittles and Pten controls sites of PI(4,5)P₂ production and Moe activation. (A) Dynamic of Pten-GFP distribution during mitosis (top). A stable cell line that expresses Grp1-PH-GFP was used to probe PI(3,4,5)P₃ distribution during mitosis in control conditions or after Pten depletion. (B, top) Time-lapse frames of a Skittles-GFP cell progressing through mitosis. Bottom images show a living cell stably expressing GFP-Tubby after Skittles depletion. (C) FACS analysis showing the distribution P-Moe intensity in mitosis (assessed by histone H3 phosphorylation) of control and Pten- or Skittles-depleted cells. a.u., arbitrary unit. (D) Distribution of Moe-GFP after Skittles depletion. (E) Rapid time-lapse imaging of a GFP-Utrophin-CH (GFP-UtrCH) and α -Tubulin-mCherry after depletion of Skittles showing maximum projection. Close-ups (focal planes) correspond to the framed region and show GFP signal in black. Arrowheads show cortical rupture and defects of F-actin recruitment at the bleb rim; arrows show unregulated mitotic blebs. Bars, 10 μ m.

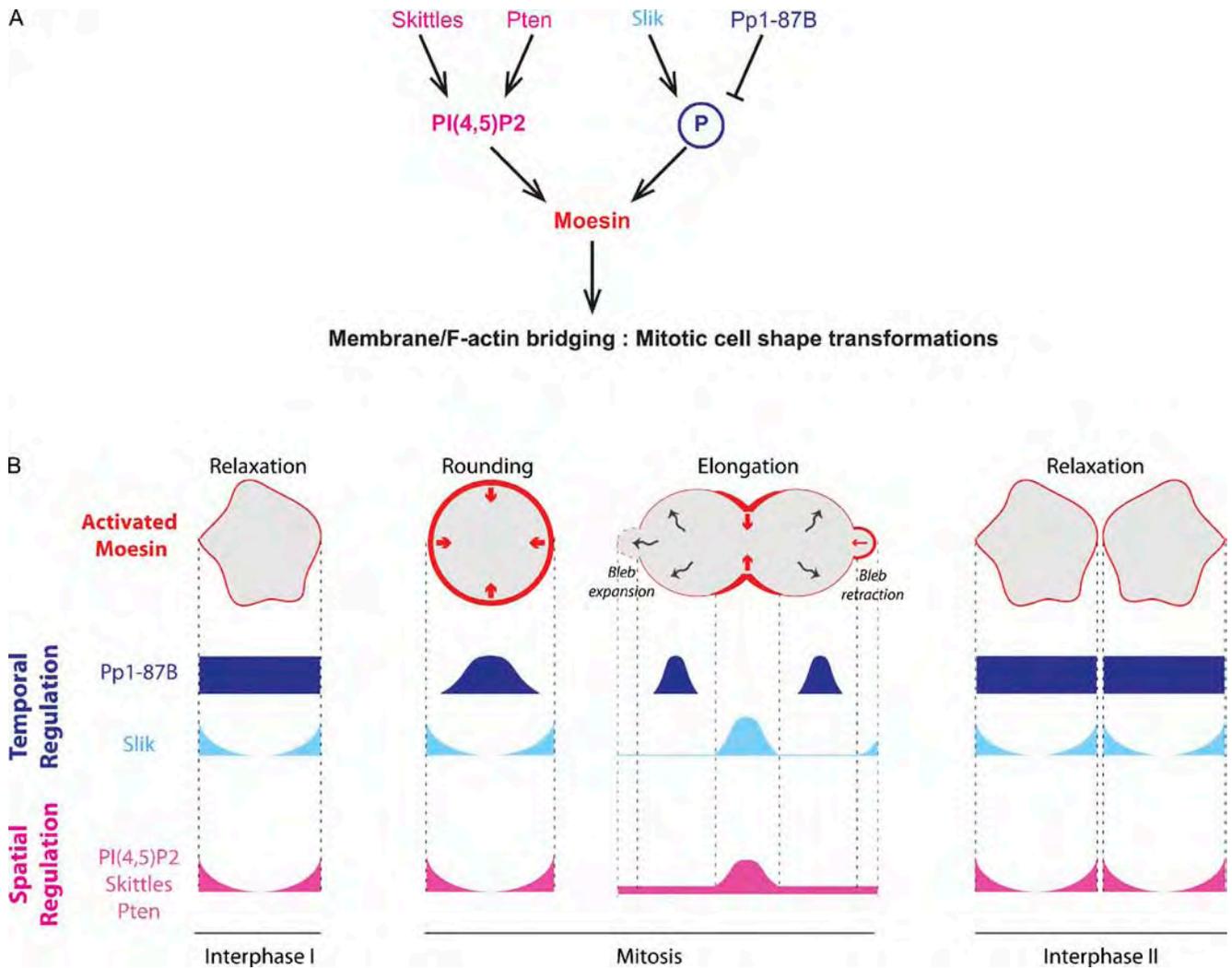


Figure 7. **Model of the spatiotemporal regulation of Moe activity throughout the successive steps of the cell cycle.** The cell cortex that comprises the plasma membrane and the underlying cytoskeleton works as a single functional unit to control cell morphology. (A) Two pathways temporally and spatially control coupling of actin filaments to the plasma membrane through the regulation of Moe activity. (B) Redistribution of the Pp1-87B phosphatase at mitosis entry is likely to promote a burst of Slik-dependent phosphorylation of Moe at early mitotic stages and then ensures Moe down-regulation at the end of division and in interphase. The localized enrichment of Skittles and Pten acts to increase PI(4,5)P₂ levels at the anaphase equator, further promoting Moe recruitment at the equator and release at the polar cortex to allow cell elongation. The same players are involved in the transient recruitment and activation of Moe at the cortex of polar blebs, which is important for their efficient retraction. P, phosphorylation.

and Slik after the anaphase onset contributes to enrich Moe at the equator and to decrease it at poles. Finally, relocalization of Pp1-87B in the cytoplasm after cytokinesis would contribute to relax the cortex for the next interphase by maintaining low Moe activity (Kunda et al., 2008; Théry and Bornens, 2008). A growing number of evidence supports that Pp1 phosphatases play important roles in the temporal control of cell division (De Wulf et al., 2009). Pp1-87B being required for mitotic spindle morphogenesis (Axton et al., 1990; Chen et al., 2007), this phosphatase could contribute to synchronize cell shape control operated through Moe regulation to chromosome segregation. Although additional investigations will be required to unravel how the activity and distribution of Pp1-87B and Slik are regulated, these results indicate that the Slik/Pp1-87B switch represents an important control of Moe activity during the cell cycle.

PI(4,5)P₂ controls stability of the mitotic cortex and spatial activation of Moe

Our results show that local levels of PI(4,5)P₂ provide an additional mechanism to regulate Moe function at the cortex of dividing cells. Several studies have established a role of PI(4,5)P₂ in the localization of ERM proteins in polarized processes of differentiated cells (Fievet et al., 2004; Hao et al., 2009; Roch et al., 2010). Here, we provide evidence that during mitosis, PI(4,5)P₂-rich membrane domains act as a spatial cue that regulates both Moe distribution and activation at the cortex.

The distribution of PI(4,5)P₂ at the plasma membrane is tightly regulated during mitosis. As in mammalian cells (Emoto et al., 2005; Field et al., 2005), we find that PI(4,5)P₂ is actively enriched at the equator of anaphase *Drosophila* S2 cells, suggesting that equatorial accumulation of PI(4,5)P₂ is a feature shared by most animal cells. Although a previous study did not detect

PI(4,5)P₂ enrichment at the cleavage furrow of *Drosophila* spermatocytes (Wong et al., 2005), whether this is caused by an intrinsic difference between mitosis and meiosis or by experimental limitations in vivo remains to be established. However, how this dynamic localization is regulated remained unknown. Here, we show that the equatorial enrichment of PI(4,5)P₂ relies, at least in part, on the enzymatic activity of Skittles and Pten. During cytokinesis, the equatorial accumulation of PI(4,5)P₂ plays a role in cleavage furrow formation and ingression, through controlling the activity and/or recruitment of several components of the contractile ring (Janetopoulos and Devreotes, 2006; Ben El Kadhi et al., 2011). PI(4,5)P₂ hydrolysis is also necessary for maintaining cleavage furrow stability and efficient cytokinesis (Emoto et al., 2005; Field et al., 2005; Wong et al., 2005). Our findings extend the functional repertoire of PI(4,5)P₂ during mitosis to the control of local properties of the mitotic cortex, which are required for polar relaxation and cell elongation. Through functional screenings, we identify novel regulators of cell division among the entire set of enzymes implicated in phosphoinositide biosynthesis. Two main pathways regulate PI(4,5)P₂ levels in mitotic cells, and their alterations provoke similar cortical disorganization. The first pathway involves the Pten tumor suppressor, a PI(3,4,5)P₃ 3-phosphatase. Pten was shown to accumulate at the septum of dividing yeast cells (Mittra et al., 2004), as well as at the cleavage furrow in *Dictyostelium discoideum* (Janetopoulos et al., 2005). Our results of living *Drosophila* cells show a progressive delocalization of Pten from the polar cortex to the equator after anaphase onset (Fig. 7 B), suggesting that Pten dynamics rely on mechanisms conserved throughout evolution. Furthermore, depletion of Pten leads to a significant enrichment of PI(3,4,5)P₃ at the cortex, especially at the cleavage furrow. These results show that Pten uses PI(3,4,5)P₃ to spatially control PI(4,5)P₂ levels at the mitotic cortex.

The second pathway relies on Skittles, a PI(4)P 5-kinase that plays a major role in regulating the levels and localization of PI(4,5)P₂ during mitosis. Skittles switches from an isotropic cortical distribution in pro/metaphase to equatorial enrichment after the anaphase onset (Fig. 7 B). Depletion of Skittles results in a phenotype similar to the mitotic cortical defects observed after inducible PI(4,5)P₂ hydrolysis. We also find that CG10260, a phosphoinositide 4-kinase, contributes to the organization of the mitotic cortex. Genetics screens have identified a role for phosphoinositide 4-kinases in the division of budding and fission yeast (Audhya et al., 2000; Hama et al., 2000; Desautels et al., 2001) as well as for cytokinesis of male spermatocytes in flies (Brill et al., 2000). CG10260 is involved in PI(4)P synthesis, the major substrate of Skittles to produce PI(4,5)P₂. Together, these data show that Skittles acts as a key regulator of PI(4,5)P₂ levels and Moe activation at the mitotic cortex. Interestingly, Skittles is required for Moe activation in *Drosophila* oocytes (Gervais et al., 2008), suggesting that this enzyme plays a broad role in the regulation of ERM proteins.

An important question is how Skittles and Pten are enriched at the equator in anaphase. It has been reported that activated RhoA stimulates a PI(4)P 5-kinase activity and promotes PI(4,5)P₂ synthesis in mammalian cells (Chong et al., 1994).

During anaphase, activated RhoA localizes at the equatorial cortex (Yoshida et al., 2009), where it could recruit and/or activates Skittles to promote PI(4,5)P₂ production. This anisotropy in PI(4,5)P₂ distribution might be in turn reinforced by the localized activity of Pten, whose membrane association is itself dependent on PI(4,5)P₂ (unpublished data; Campbell et al., 2003; Rahdar et al., 2009). Together, the activity of Skittles and Pten could therefore provide a feed-forward regulatory loop of local PI(4,5)P₂ levels at the cortex of dividing cells.

Spatiotemporal regulation of Moe contributes to mitotic cell elongation

The metaphase/anaphase transition is characterized by a break in cortical symmetry, with concomitant relaxation of the polar cortex and contraction of the equator. We find that the anisotropic distribution of Moe participates in coordinating this differential in cortical tension. Overactivation of Moe impairs cell elongation and causes cytokinesis failure, suggesting that the polar cortex is too rigid for cell division. Accumulation of F-actin at the cleavage furrow can be attributed, at least in part, to a cortical flow of F-actin filaments from polar regions to the equator (Chen et al., 2008). Overactivation of Moe at the poles could block this actin cortical flow, through an excessive bridging of the actin cytoskeleton with the plasma membrane, leading to an abnormal stiffness of the polar cortex. Therefore, redistribution of activated Moe from the polar cortex to the equator participates in polar relaxation, anaphase cell elongation, and cytokinesis fidelity.

Contraction of the equatorial actomyosin ring increases the cytoplasmic pressure exerted on the plasma membrane. Relaxation of the polar cortex is thus required to dissipate this extra pressure by increasing the cellular volume, a process that was proposed to involve short-lived polar blebs (Prothero and Spencer, 1968; Brugués et al., 2010; Sedzinski et al., 2011). These polar blebs were recently found to play important roles during cell division. Perturbation of their dynamics triggers anaphase spindle rocking (Rankin and Wordeman, 2010) and destabilization of cleavage furrow positioning (Sedzinski et al., 2011). Although recent studies have addressed how cortical blebs are regulated in interphase (Charras et al., 2005, 2006), our understanding of the signalization that controls dynamics of cortical blebs in mitosis has poorly progressed since pioneering studies. Our results show that a transient recruitment of Moe at the mitotic bleb membrane is required for efficient polar bleb retraction, as are the functions of the Moe positive regulators Slik, Skittles, and Pten. Active Moe contributes to cortical bleb organization because alteration of Moe function (or regulation) disrupts actin organization and efficient bleb retraction. This leads to disorganization of the mitotic cortex, characterized by giant blebs that continue growing in an unregulated manner. Therefore, although a global decrease in Moe activity at the polar cortex contributes to cell elongation and cytokinesis, transient and local association of Moe at the rim of polar blebs is important for their retraction. If the binding of Moe to PI(4,5)P₂ is required at both the equator and bleb membrane, the influence of the Slik kinase on Moe activation appears different between these two regions of the anaphase cortex. Although Slik depletion abolishes

Moe recruitment to polar blebs, remnants of cortical Moe are still visible at the equator, likely as a result of high PI(4,5)P₂ levels at the furrow.

Although these mechanisms synergistically contribute to the cortical contractility at the equator, they also allow cortical relaxation at the polar cortex through control of transient anaphase blebs. We propose that this dual mechanism of Moe regulation is exploited by animal cells to ensure proper cell division.

Materials and methods

DNA constructs

Pten cDNA obtained from V. Archambault (Institute for Research in Immunology and Cancer, Montréal, Québec, Canada; IP16020; Drosophila Genomics Resource Center) was amplified by PCR (Phusion; New England Biolabs, Inc.) and fused to GFP in the pAc5.1 vector (Invitrogen). RCs (PM-FRB-monomeric RFP [mRFP] and mRFP-FKBP-5-phosphatase domain) obtained from T. Balla (National Institutes of Health, Bethesda, MD; Varnai et al., 2006) and GFP-Utrophin-CH obtained from W.M. Bement (University of Wisconsin, Madison, WI; Burkel et al., 2007) were subcloned in the pAc5.1 vector (Invitrogen). pUAS-Skittles-GFP was obtained from A. Guichet (Institut Jacques Monod, Unité Mixte de Recherche 7592, Paris, France; Gervais et al., 2008), pUAS-Slik-GFP was obtained from D. Hipfner (Institut de Recherches Cliniques de Montréal, Montréal, Québec, Canada; Hipfner et al., 2004), and pUAS-GFP-Tubby and pTubulin-Grp1-PH-GFP were obtained from A.A. Kiger (University of California, San Diego, San Diego, CA). Other DNA constructs were previously described in Carreno et al. (2008).

dsRNA primers

dsRNA primers used in this study were as follows: Skittles_1 forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAAGTATGAGCACCATAAGCG-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGAATGTTTCAGTGGAA-ATGTGG-3'; Skittles_2 forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACC-CCTCCAAGCGCAAAAACCTCG-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACT-ATAGGGAGAGCGTGGACGTGTAGCTGGGCG-3'; Pten forward, 5'-TAA-TACGACTCACTATAGGGAGACAAACGCAAAACAGCCTAATAGC-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAAGTGAATTTGGAG-AGG-3'; Pten_1 forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATATCCA-GCACCAGATAAATA-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-AGACAAGGTTTTCAGTCTATCTGG-3'; Pten_2 forward, 5'-TAATAC-GACTCACTATAGGGAGACATCAATACCAGTTTCCGGCG-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATCGAAGTATTTTTGAA-TTGG-3'; CG10260_1 forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAC-GATTCGGTGAACGAGCTGCG-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACT-ATAGGGAGATCGGCGAAGTCTTCAAGCGC-3'; CG10260_2 forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCTGTGCTGCTGCAGGGC-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCGGCACTATAA-GATCCGGC-3'; Pp1-87B forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAG-ATCCGAAATTAAGATTTCCAGG-3', and reverse, 5'-TAATACGACTC-ACTATAGGGAGAAAAGATCTCTCGTCGACAATGG-3'; Pp1-87B 5'UTR forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACGGCAGTGTGGCAAC-ATCAGTAGAAGC-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-AGAGTTTTCGTCGCAAAAGTGGATCTGG-3'; Pp1-87B 3'UTR forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGATACACAACTGCAGCACCACG-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTGTCTACTACTTAA-GGCC-3'; CG10260 forward, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAGGA-GTATCCCAATCAGATCCC-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACTATAGG-GAGAATCAGTATGGGCTTGTGACCC-3'; and Slik forward, 5'-TAATACGAC-TCACTATAGGGAGAAGTGTCAAAGGGTAAGGC-3', and reverse, 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGAACCCTCACITTCATCCAGTTTGC-3'.

Cell lines and culture

S2 *Drosophila* cells were cultured under standard conditions. We generated stable cell lines expressing wild-type Moe-GFP, Moe-TA-GFP, Moe-TD-GFP, FERM^{Moe}-GFP, Moe-KN-GFP, GFP-Utrophin-CH, GFP-Tubby, and Grp1-PH-GFP in combination with Tubulin-mCherry to identify mitotic stages. We used FACS sorting (FACS Aria; BD) to select cell lines expressing moderate levels of the different GFP fusions. The distribution of Pp1-87B-GFP, Skittles-GFP, Pten-GFP, and Slik-GFP was analyzed after transient transfection (FuGENE HD; Roche) of the corresponding constructs. Cells stably expressing Moe-GFP or GFP-Tubby were transfected by the RC constructs 36 h before rapamycin addition (final concentration of 100 nM).

dsRNA-mediated screenings

Phosphatase subunits and phosphoinositide enzymes were identified by annotation of the fly genome complemented by a search for individual orthologues of mammalian counterparts. Production of dsRNA was previously described in Carreno et al. (2008). dsRNA were synthesized using DNA templates from the *Drosophila* dsRNA library (Thermo Fisher Scientific). Each positive hit was confirmed by the use of at least one additional dsRNA, targeting an independent region of the gene of interest to avoid off targets.

Immunofluorescence and video microscopy

Cells were cultured for 4 h on glass coverslips, fixed in 4% formaldehyde (or 10% TCA for P-Moe), and processed for immunostaining (Carreno et al., 2008). We used anti-P-Moe (Carreno et al., 2008) at 1:100, anti- α -tubulin coupled to FITC (F2168; Sigma-Aldrich) at 1:50, and Texas red goat anti-rabbit (Invitrogen) at 1:200. Texas red phalloidin (Invitrogen) was used at 1:100 for F-actin staining. Fixed imaging was performed at room temperature using mounting medium (Vectashield; Vector Laboratories) on a microscope (DeltaVision; Applied Precision) using softWoRx software (Applied Precision) equipped with a camera (CoolSNAP HQ2; Photometrics) at 1 × 1 binning and 60x Plan Achromat (1.42 NA) objective.

For live imaging, cell lines were cultivated in glass-bottom plates and multichannel images were acquired at 27°C with a microscope (DeltaVision) using softWoRx software equipped with a camera (CoolSNAP HQ2) at 2 × 2 binning and 60x Plan Achromat (1.42 NA) objective or a wide-field microscope (DMIRE2; Leica) using Metamorph software (Molecular Devices) equipped with a camera (CoolSNAP HQ2) at 2 × 2 binning and 63x Plan Achromat (1.32 NA). Images were acquired every 15 or 7 min for broad analyses of cell division and every 7 or 20 s for fast tracking of bleb dynamics. Images were analyzed using Metamorph, softWoRx Explorer, and ImageJ (National Institutes of Health) packages. Images were deconvoluted using Scientific Volume Imaging or softWoRx and processed with Photoshop (Adobe).

Dosage of phosphoinositides

S2 cells labeled with [³²P]phosphate were processed for lipid extraction and separation by TLC using CHCl₃/CH₃COCH₃/CH₃OH/CH₃COOH/H₂O (80:30:26:24:14 vol/vol) as a solvent. The TLC plate (silica gel 60 with concentrating zone; Merck) had been treated with 1% potassium-oxalate in 2 mM EDTA/methanol (vol/vol) for 15 min and activated at 100°C for 1 h. Spots corresponding to phosphoinositol phosphate and PI(4,5)P₂ were visualized with a PhosphorImager scanner (GE Healthcare), identified by comparison with the migration of authentic standards, scraped off separately, and deacylated by adding 1 ml methylamine reagent composed of 26.8% (vol/vol) of 40% methylamine, 45.7% (vol/vol) methanol, 11.4% (vol/vol) n-butanol, and 16% (vol/vol) H₂O to the silica powder. After incubation at 53°C for 50 min, the methylamine reagent was completely evaporated under a nitrogen stream at 37°C. The samples were resuspended in 1.2 ml H₂O and separated by HPLC using a column (Partisphere 5 SAX; Whatman) 4.6 × 125 mm with guard cartridge anion exchanger units (Whatman) and a gradient of 1 M (NH₄)₂HPO₄, pH 3.8, and bidistilled water as previously described (Payrastré, 2004).

SDS-PAGE and P-Moe Western blotting

For each condition (controls, dsRNA, or 50 nM Calyculin A-treated cells), 10⁶ cells were washed with 1 ml PBS NaF/Na₃VO₄/β-glycerophosphate (50 mM/1 mM/40 mM). After centrifugation (5 min at 4°C), pellets were resuspended in 100 μl Laemmli buffer at 95°C supplemented with antiphosphatases and antiprotease cocktail (Roche). Membranes were blocked with TBS Tween/BSA/NaF/Na₃VO₄/β-glycerophosphate (0.1%/2%/50 mM/5 mM/40 mM) and then incubated with an antibody against Moe (1:25,000) or P-Moe (1:200).

Flow cytometry

Cells were fixed for 4 h using ethanol 75% and permeabilized by 0.02% saponin. Cells were labeled using anti-P-Moe (1:100), antiphospho-histone H3 (Ser10) 647 conjugate (1:100; Cell Signaling Technology), and Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:1,000; Invitrogen) antibodies. Cells were then analyzed by FACS (LSR II; BD).

Online supplemental material

Fig. S1 shows localization of sqh-GFP during mitotic blebbing and quantification of mitotic bleb dynamics in control and Slik dsRNA conditions. Fig. S2 shows characterization of Pp1-87B function during cell division. Fig. S3 shows localization of Moe-TA-GFP during cell division. Fig. S4 shows quantification

of the RC experiments shown in Fig. 4. Fig. S5 shows the results of the functional screen for enzymes implicated in phosphoinositide metabolism shown in Fig. 5. Video 1 shows the dynamic localization of Moe-GFP during division of a control cell over a 25-min period with a 1-min interval (as shown in Fig. 1 B). Video 2 shows the dynamic localization of Moe-GFP during division of a control cell over a 675-s period with a 7-s interval (as shown in Fig. 2 A). Video 3 shows the dynamic localization of Moe-GFP during division of a Slik-depleted cell over a 500-s period with a 20-s interval (as shown in Fig. 2 A). Video 4 shows the dynamic localization of Utrophin-CH-GFP (as an F-actin probe) during division of a control cell over a 337.5-s period with a 2.5-s interval (as shown in Fig. 2 C). Video 5 shows the dynamic localization of Utrophin-CH-GFP (as an F-actin probe) during division of a Slik-depleted cell over a 225-s period with a 2.5-s interval (as shown in Fig. 2 C). Video 6 shows the dynamic localization of GFP-Tubby (as a PI(4,5)P₂ probe) in interphase RC cells before and after addition of rapamycin over a 450-s period with a 15-s interval (as shown in Fig. 4 E). Video 7 shows the dynamic localization of Moe-GFP of a metaphase RC cell before and after addition of rapamycin over a 300-s period with a 10-s interval (as shown in Fig. 4 E). Video 8 shows the dynamic localization of Moe-GFP of an ana/telophase RC cell 435 s after addition of rapamycin over a 603-s period with a 9-s interval (as shown in Fig. 4 F). Video 9 shows the dynamic localization of Moe-GFP during division of a Skittles-depleted cell over a 90-min period with a 10-min interval (as shown in Fig. 6 D). Video 10 shows the dynamic localization of Utrophin-CH-GFP (as an F-actin probe) during division of a Skittles-depleted cell over a 217.5-s period with a 7.5-s interval (as shown in Fig. 6 E). Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201106048/DC1>.

We are grateful to A.A. Kiger, G. Hickson, T. Balla, W.M. Bement, A. Guichet, V. Archambault, D.R. Hipfner, and P. Roux for antibodies, cell lines, DNA clones, and reagents. We thank C. Charbonneau, P. Maddox, and A.S. Maddox (Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie) and A. Leru, B. Ronsin, and P. Cochard (Centre de Biologie du Développement and Plate-Forme Infrastructures Biologie Santé et Agronomie d'Imagerie Cellulaire de Toulouse) for help with microscopy, Danièle Gagné for her help in cell sorting, other laboratory members for their continuous help, and A.S. Maddox, S. Tournier, J.C. Labbé, A. Merdes, and Y. Gachet for critical reading and comments on the manuscript.

This work was supported by the Canadian Institutes for Health Research (grant MOP-89877) to S. Carreno and from the Association pour la Recherche contre le Cancer (grants 3832 and 1111), Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe 2005), and Agence Nationale de la Recherche Blanc to F. Payre (Netoshape) and to B. Payrastré (Phosphoinopathe and Myotubularinopathies). C. Roubinet was supported by fellowships from Ministère de la Recherche et de l'Éducation Supérieure, fondation Lavoisier, European Molecular Biology Organization, and Association pour la Recherche contre le Cancer. J.F. Dorn was supported by the Canadian Cancer Society (grants 018450 and 019162) and the Terry Fox Foundation (awarded to P. Maddox and A.S. Maddox, respectively) and is a fellow of the Swiss National Science Foundation. S. Carreno is a Fonds de la Recherche en Santé du Québec Junior fellow. Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie is supported in part by the Canadian Center of Excellence in Commercialization and Research, the Canada Foundation for Innovation, and the Fonds de Recherche en Santé du Québec.

Submitted: 8 June 2011

Accepted: 2 September 2011

References

Audhya, A., M. Foti, and S.D. Emr. 2000. Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Mol. Biol. Cell.* 11:2673–2689.

Axton, J.M., V. Dombrádi, P.T. Cohen, and D.M. Glover. 1990. One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell.* 63:33–46. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90286-N](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(90)90286-N)

Ben El Kadhi, K., C. Roubinet, S. Solinet, G. Emery, and S. Carreno. 2011. The inositol 5-phosphatase dOCRL controls PI(4,5)P₂ homeostasis and is necessary for cytokinesis. *Curr. Biol.* 21:1074–1079. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.030>

Boucrot, E., and T. Kirchhausen. 2007. Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:7939–7944. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0702511104>

Brill, J.A., G.R. Hime, M. Scharer-Schuksz, and M.T. Fuller. 2000. A phospholipid kinase regulates actin organization and intercellular bridge formation during germline cytokinesis. *Development.* 127:3855–3864.

Brugués, J., B. Maugis, J. Casademunt, P. Nassoy, F. Amblard, and P. Sens. 2010. Dynamical organization of the cytoskeletal cortex probed by micropipette aspiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:15415–15420. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0913669107>

Burkel, B.M., G. von Dassow, and W.M. Bement. 2007. Versatile fluorescent probes for actin filaments based on the actin-binding domain of utrophin. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 64:822–832. <http://dx.doi.org/10.1002/cm.20226>

Burton, K., and D.L. Taylor. 1997. Traction forces of cytokinesis measured with optically modified elastic substrata. *Nature.* 385:450–454. <http://dx.doi.org/10.1038/385450a0>

Campbell, R.B., F. Liu, and A.H. Ross. 2003. Allosteric activation of PTEN phosphatase by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 278:33617–33620. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C300296200>

Carreno, S., I. Kouranti, E.S. Glusman, M.T. Fuller, A. Echard, and F. Payre. 2008. Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J. Cell Biol.* 180:739–746. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200709161>

Charras, G.T., J.C. Yarrow, M.A. Horton, L. Mahadevan, and T.J. Mitchison. 2005. Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature.* 435:365–369. <http://dx.doi.org/10.1038/nature03550>

Charras, G.T., C.K. Hu, M. Coughlin, and T.J. Mitchison. 2006. Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs. *J. Cell Biol.* 175:477–490. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200602085>

Chen, F., V. Archambault, A. Kar, P. Lio', P.P. D'Avino, R. Sinka, K. Lilley, E.D. Laue, P. Deak, L. Capalbo, and D.M. Glover. 2007. Multiple protein phosphatases are required for mitosis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 17:293–303. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.068>

Chen, W., M. Foss, K.F. Tseng, and D. Zhang. 2008. Redundant mechanisms recruit actin into the contractile ring in silkworm spermatocytes. *PLoS Biol.* 6:e209. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0060209>

Cheng, J., A. Tiyaboonchai, Y.M. Yamashita, and A.J. Hunt. 2011. Asymmetric division of cyst stem cells in *Drosophila* testis is ensured by anaphase spindle repositioning. *Development.* 138:831–837. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.057901>

Chong, L.D., A. Traynor-Kaplan, G.M. Bokoch, and M.A. Schwartz. 1994. The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells. *Cell.* 79:507–513. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90259-3](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(94)90259-3)

Coscoy, S., F. Waharte, A. Gautreau, M. Martin, D. Louvard, P. Mangeat, M. Arpin, and F. Amblard. 2002. Molecular analysis of microscopic ezrin dynamics by two-photon FRAP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99:12813–12818. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.192084599>

Desautels, M., J.P. Den Haese, C.M. Slupsky, L.P. McIntosh, and S.M. Hemmingsen. 2001. Cdc4p, a contractile ring protein essential for cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*, interacts with a phosphatidylinositol 4-kinase. *J. Biol. Chem.* 276:5932–5942. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M008715200>

De Wulf, P., F. Montani, and R. Visintin. 2009. Protein phosphatases take the mitotic stage. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21:806–815. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cob.2009.08.003>

Emoto, K., H. Inadome, Y. Kanaho, S. Narumiya, and M. Umeda. 2005. Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 280:37901–37907. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M504282200>

Fehon, R.G., A.I. McClatchey, and A. Bretscher. 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:276–287. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2866>

Field, S.J., N. Madson, M.L. Kerr, K.A. Galbraith, C.E. Kennedy, M. Tahiliani, A. Wilkins, and L.C. Cantley. 2005. PtdIns(4,5)P₂ functions at the cleavage furrow during cytokinesis. *Curr. Biol.* 15:1407–1412. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.059>

Fievet, B.T., A. Gautreau, C. Roy, L. Del Maestro, P. Mangeat, D. Louvard, and M. Arpin. 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *J. Cell Biol.* 164:653–659. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200307032>

Fishkind, D.J., L.G. Cao, and Y.L. Wang. 1991. Microinjection of the catalytic fragment of myosin light chain kinase into dividing cells: effects on mitosis and cytokinesis. *J. Cell Biol.* 114:967–975. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.114.5.967>

Flemming, W. 1882. Zellsubstanz, Kern und Zellteilung. F.C.W. Vogel, Leipzig, Germany. 478 pp.

Gervais, L., S. Claret, J. Januschke, S. Roth, and A. Guichet. 2008. PIP5K-dependent production of PIP₂ sustains microtubule organization to establish polarized transport in the *Drosophila* oocyte. *Development.* 135:3829–3838. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.029009>

Gray, A., J. Van Der Kaay, and C.P. Downes. 1999. The pleckstrin homology domains of protein kinase B and GRP1 (general receptor for

- phosphoinositides-1) are sensitive and selective probes for the cellular detection of phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate and/or phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in vivo. *Biochem. J.* 344:929–936. <http://dx.doi.org/10.1042/0264-6021:3440929>
- Hama, H., J.Y. Takemoto, and D.B. DeWald. 2000. Analysis of phosphoinositides in protein trafficking. *Methods.* 20:465–473. <http://dx.doi.org/10.1006/meth.2000.0959>
- Hao, J.J., Y. Liu, M. Kruhlik, K.E. Debell, B.L. Rellahan, and S. Shaw. 2009. Phospholipase C-mediated hydrolysis of PIP2 releases ERM proteins from lymphocyte membrane. *J. Cell Biol.* 184:451–462. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200807047>
- Hickson, G.R., A. Echard, and P.H. O'Farrell. 2006. Rho-kinase controls cell shape changes during cytokinesis. *Curr. Biol.* 16:359–370. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.12.043>
- Hipfner, D.R., N. Keller, and S.M. Cohen. 2004. Slik Sterile-20 kinase regulates Moesin activity to promote epithelial integrity during tissue growth. *Genes Dev.* 18:2243–2248. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.303304>
- Janetopoulos, C., and P. Devreotes. 2006. Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. *J. Cell Biol.* 174:485–490. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200603156>
- Janetopoulos, C., J. Borleis, F. Vazquez, M. Iijima, and P. Devreotes. 2005. Temporal and spatial regulation of phosphoinositide signaling mediates cytokinesis. *Dev. Cell.* 8:467–477. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.02.010>
- Kunda, P., A.E. Pelling, T. Liu, and B. Baum. 2008. Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. *Curr. Biol.* 18:91–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2007.12.051>
- Luxenburg, C., H.A. Pasolli, S.E. Williams, and E. Fuchs. 2011. Developmental roles for Srf, cortical cytoskeleton and cell shape in epidermal spindle orientation. *Nat. Cell Biol.* 13:203–214. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2163>
- Maddox, A.S., and K. Burridge. 2003. RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J. Cell Biol.* 160:255–265. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200207130>
- Matzke, R., K. Jacobson, and M. Radmacher. 2001. Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells. *Nat. Cell Biol.* 3:607–610. <http://dx.doi.org/10.1038/35078583>
- Mitra, P., Y. Zhang, L.E. Rameh, M.P. Ivshina, D. McCollum, J.J. Nunnari, G.M. Hendricks, M.L. Kerr, S.J. Field, L.C. Cantley, and A.H. Ross. 2004. A novel phosphatidylinositol(3,4,5)P₃ pathway in fission yeast. *J. Cell Biol.* 166:205–211. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200404150>
- Payrastré, B. 2004. Phosphoinositides: lipid kinases and phosphatases. *Methods Mol. Biol.* 273:201–212.
- Porter, K., D. Prescott, and J. Frye. 1973. Changes in surface morphology of Chinese hamster ovary cells during the cell cycle. *J. Cell Biol.* 57:815–836. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.57.3.815>
- Prothero, J.W., and D. Spencer. 1968. A model of blebbing in mitotic tissue culture cells. *Biophys. J.* 8:41–51. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495\(68\)86473-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3495(68)86473-2)
- Rahdar, M., T. Inoue, T. Meyer, J. Zhang, F. Vazquez, and P.N. Devreotes. 2009. A phosphorylation-dependent intramolecular interaction regulates the membrane association and activity of the tumor suppressor PTEN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106:480–485. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0811212106>
- Rankin, K.E., and L. Wordeman. 2010. Long astral microtubules uncouple mitotic spindles from the cytokinetic furrow. *J. Cell Biol.* 190:35–43. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201004017>
- Rappaport, R. 1971. Cytokinesis in animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 31:169–213. [http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60059-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60059-5)
- Roch, F., C. Polesello, C. Roubinet, M. Martin, C. Roy, P. Valenti, S. Carreno, P. Mangeat, and F. Payre. 2010. Differential roles of PtdIns(4,5)P₂ and phosphorylation in moesin activation during *Drosophila* development. *J. Cell Sci.* 123:2058–2067. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.064550>
- Rogers, S.L., U. Wiedemann, U. Häcker, C. Turck, and R.D. Vale. 2004. *Drosophila* RhoGEF2 associates with microtubule plus ends in an EB1-dependent manner. *Curr. Biol.* 14:1827–1833. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2004.09.078>
- Sedzinski, J., M. Biro, A. Oswald, J.Y. Tinevez, G. Salbreux, and E. Paluch. 2011. Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow. *Nature.* 476:462–466. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10286>
- Stewart, M.P., J. Helenius, Y. Toyoda, S.P. Ramanathan, D.J. Muller, and A.A. Hyman. 2011. Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature.* 469:226–230. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09642>
- Surcel, A., Y.S. Kee, T. Luo, and D.N. Robinson. 2010. Cytokinesis through biochemical-mechanical feedback loops. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21:866–873. <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.08.003>
- Szentpetery, Z., A. Balla, Y.J. Kim, M.A. Lemmon, and T. Balla. 2009. Live cell imaging with protein domains capable of recognizing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; a comparative study. *BMC Cell Biol.* 10:67. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2121-10-67>
- Théry, M., and M. Bornens. 2008. Get round and stiff for mitosis. *HFSP J.* 2:65–71. <http://dx.doi.org/10.2976/1.2895661>
- Trinkle-Mulcahy, L., J. Andersen, Y.W. Lam, G. Moorhead, M. Mann, and A.I. Lamond. 2006. Repo-Man recruits PP1 γ to chromatin and is essential for cell viability. *J. Cell Biol.* 172:679–692. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200508154>
- Varnai, P., B. Thyagarajan, T. Rohacs, and T. Balla. 2006. Rapidly inducible changes in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels influence multiple regulatory functions of the lipid in intact living cells. *J. Cell Biol.* 175:377–382. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200607116>
- Wong, R., I. Hadjiyanni, H.C. Wei, G. Polevoy, R. McBride, K.P. Sem, and J.A. Brill. 2005. PIP2 hydrolysis and calcium release are required for cytokinesis in *Drosophila* spermatocytes. *Curr. Biol.* 15:1401–1406. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.060>
- Yoshida, S., S. Bartolini, and D. Pellman. 2009. Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev.* 23:810–823. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1785209>

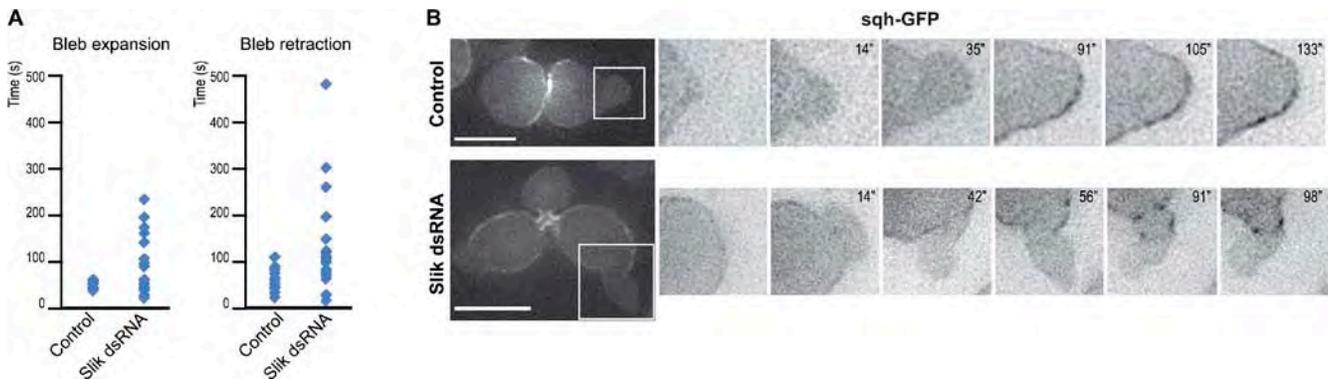
Roubinet et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201106048/DC1>

Figure S1. **Moe activation controls anaphase relaxation.** (A) The lifetime of individual blebs were plotted according to their expanding (left) or retraction (right) phase, as visualized by time-lapse microscopy, in controls cells or after Slik dsRNA depletion. (B) Rapid time-lapse imaging of a sqh-GFP cell line in control conditions (top) and after Slik depletion. Close-ups correspond to the framed region and show the GFP signal in black. Bars, 10 μ m.

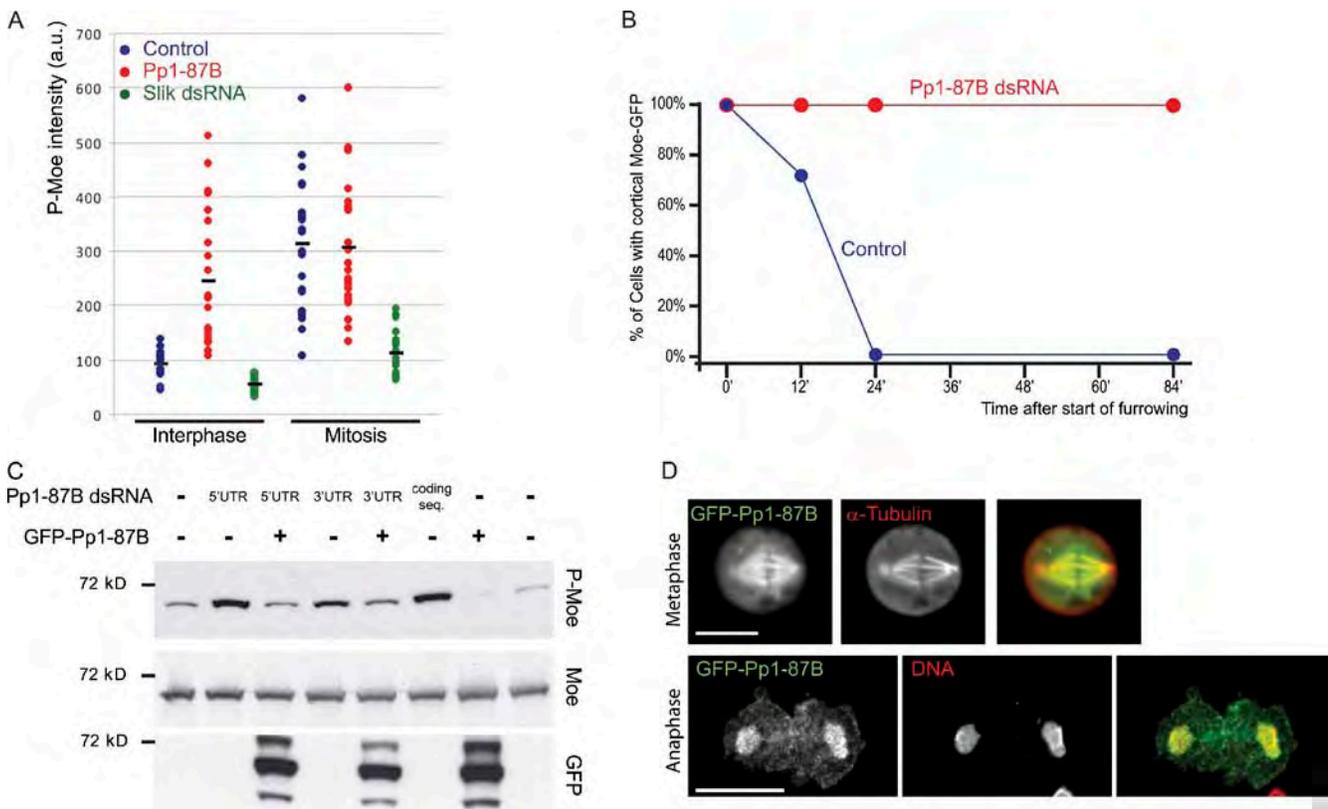


Figure S2. **Pp1-87B regulates mitotic Moe activation.** (A) Quantification of P-Moe signal observed in control S2 cells or after depletion of Pp1-87B or Slik in interphase and metaphase ($n = 23$). Horizontal lines are mean values for each condition. a.u., arbitrary unit. (B) The graph plots the percentage of cells showing Moe-GFP signal at the polar cortex at different times after furrow ingression ($n = 40$). (C) Protein extracts from S2 cells treated by the indicated dsRNAs and transiently transfected or not transfected with GFP-Pp1-87B (not targeted by the Pp1-87B 5'UTR or 3'UTR) were analyzed by Western blotting using antibodies against Moe (middle), T559-phosphorylated Moe (P-Moe; top), or GFP (bottom). seq., sequence. (D) Localization of GFP-Pp1-87B in dividing S2 cells undergoing metaphase (top images) or anaphase (bottom images), showing accumulation of Pp1-87 on the metaphase spindle (red) or on chromosomes (red), respectively. Bars, 10 μ m.

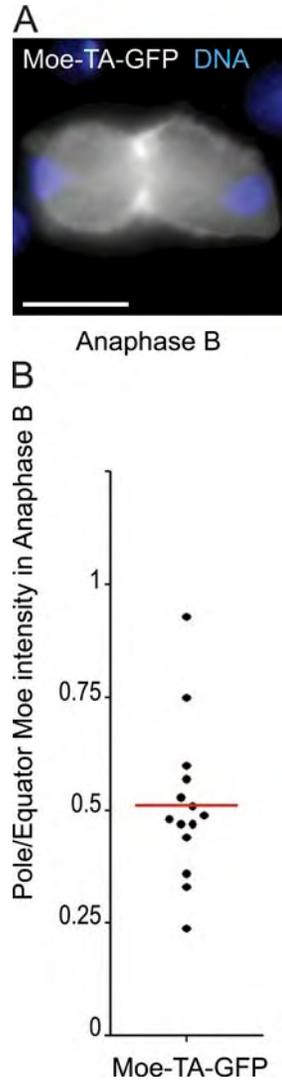


Figure S3. **The nonphosphorylatable form of Moe is anisotropically distributed during anaphase elongation.** (A) Stable cell line expressing an unphosphorylatable Moe (Moe-TA-GFP) was fixed and labeled for DNA. Anaphase cell displaying significant enrichment of unphosphorylatable Moe at the equator region. (B) The graph plots the pole/equator ratio of Moe-TA-GFP signal for individual anaphase B cells, confirming preferential equatorial distribution. The horizontal line is the mean value of the experiment. Bars, 10 μ m.

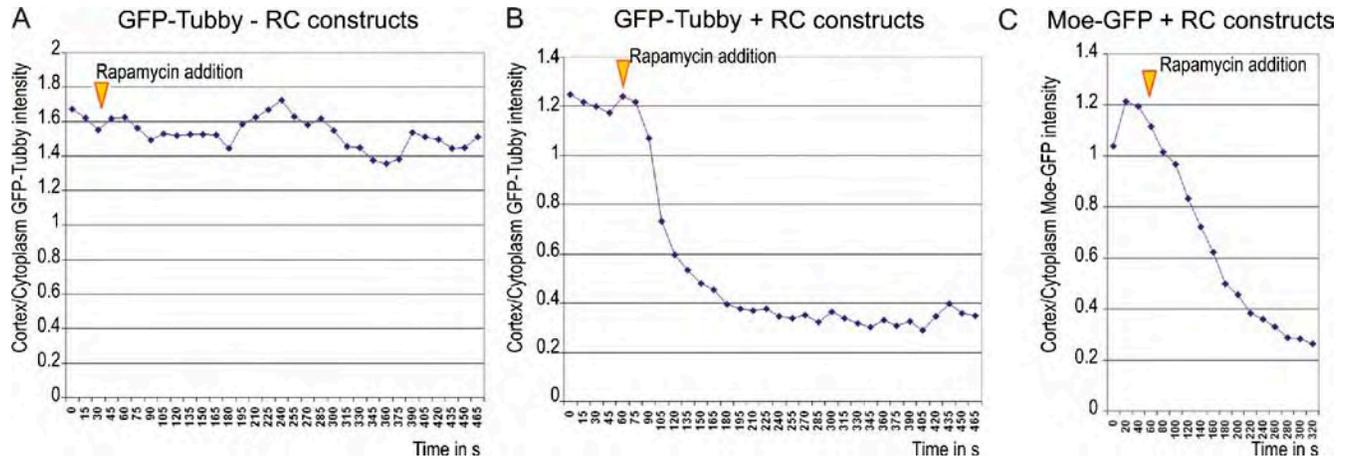
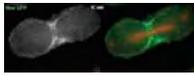


Figure S4. **PI(4,5)P₂ depletion in metaphase triggers Moe redistribution from the cortex to the cytoplasm.** (A and B) The graphs plot time course of the decay of cortex-associated GFP signal after rapamycin addition in cells stably expressing GFP-Tubby without RC constructs (A) or with RC constructs (B). (C) Consequences of rapamycin addition on Moe-GFP distribution in RC-expressing cells.

Family	No. CG	Gene Name	Putative human orthologue	Cortical instability		PIP2 (% WT)	Comments
				1st screen Blebs CG/WT	2nd Screen on Moe-GFP		
PI3K	CG2699	Pi3K21B	PIK3R1, 2 & 3	0.99			
	CG4141	Pi3K92E	PIK3CB, CA & CD	1.23			
	CG5373	Pi3K59F	PIK3C3	1.54			
	CG11621	Pi3K68D	PIK3C2B, A & G	1.49			
PI4K	CG10260	PI4KIIalpha	PI1KAP2, PI4KA	1.97	+++	85%	
	CG7004	fwd	PI4KB	2.36	+ / -	93%	
PIP5K	CG3682	PIP5K59B	PIP5K1A, B & C	1.03			
	CG17471	PIP5K102E	PIP4K2B	1.03			
	CG6355	fab1	PIKFYVE	1.85		96%	
	CG9985	Skittles	PIP5K1A, B, C & PIPSL	2.62	+++	52%	
PIP3-3P	CG5671	Pten	PTEN	2.02	+++	69%	
IMP	CG9391	-----	IMPA2 & 1	1.14			
	CG9389	-----	IMPA2 & 1	1.13			
	CG17026	-----	IMPA2 & 1	1.26			
	CG17029	-----	IMPA2 & 1	0.99			
	CG17028	-----	IMPA2 & 1	0.99			
	CG17027	-----	IMPA2 & 1	1.06			
IPP	CG3573	-----	OCRL, INPP5B	0.62			Giant cells / Binucleation
	CG6562	-----	SYNJ1 & 2	0.72			
	CG6805	-----	INPP5K & J	0.88			
	CG9784	-----	INPP5K & J	0.81			
	CG10426	pharbin-like	INPP5E	1.09			
	CG31110	5PtlaseI	INPP5A	0.92			
Myotubularin	CG3530	MYOTUBULARIN-like	MTMR6, 7 & 8	1.65			
	CG3632	MYOTUBULARIN-like	MTMR3 & 4	1.42			
	CG9115	mtm	MTMR2, M1 & MR1	1.65			Giant cells / Binucleation
	CG3620	norpA	PLCB4	1.02			
PL C	CG4200	sl	PLCG1 & 2	1.2			
	CG4574	Plc21C	PLCB3, B1 & B2	1.16			
	CG14945	-----	-----	1.24			
	CG10747	-----	PLCXD2, D3 & D1	1.09			

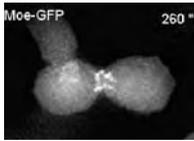
Figure S5. **A functional screen for enzymes implicated in phosphoinositide metabolism.** The table reports each gene that has been depleted using dsRNA treatment in S2 cells according to their predicted molecular function. Gene names include coding gene (CG) number and synonymous when available as well as respective putative human orthologues. The primary screen was performed on a S2 cell line that stably expresses Tubulin-GFP, and the frequency of cortical deformations is represented with respect of observed cortical dynamics observed in control cells. For each candidate displaying highest perturbations, a second assay was performed using a stable Moe-GFP cell to analyze cortical dynamics, confirming the influence of Skittles, Pten, and CG10260. Accordingly, biochemical dosage of PI(4,5)P₂ reveals a significant decrease in intracellular pools of this phosphoinositide (PI) after individual depletion of these three genes. In addition, depletion of *mtm* and CG3573 further impinge on cell division, leading to a high proportion of bi/multinucleated cells. Colors correspond to phenotype penetrance: yellow, weak; orange, intermediate; red, high. IMP, inositol monophosphate phosphatase; IPP, inositol polyphosphate phosphatase; PI4K, phosphoinositide 4-kinase; WT, wild type.



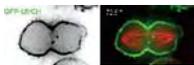
Video 1. **Localization of Moe-GFP and α -Tubulin-mCherry in dividing control S2 cells as shown in Fig. 1 B.** Dividing stable cell line expressing Moe-GFP (white, left; green, right) and α -Tubulin-mCherry (red, right). Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision) and deconvolved using softWoRx software. Frames (maximum projections) were collected every 1 min. Time compression is 300.



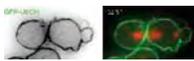
Video 2. **Localization of Moe-GFP in dividing control S2 cells as shown in Fig. 2 A.** Dividing stable cell line expressing Moe-GFP (black). Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision) and deconvolved using softWoRx software. Frames (focal plane) were collected every 7 s. Time compression is 112.5.



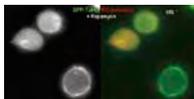
Video 3. **Localization of Moe-GFP in dividing Slik-depleted S2 cells as shown in Fig. 2 A.** Dividing Slik dsRNA-depleted cell stably expressing Moe-GFP (white). Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision) and deconvolved using softWoRx software. Frames (maximum projections) were collected every 20 s. Time compression is 100.



Video 4. **Localization of Utrophin-GFP and α -Tubulin-mCherry in dividing control S2 cells as shown in Fig. 2 C.** Dividing stable cell line expressing Utrophin-GFP (GFP-UtrCH; black, left; green, right) and α -Tubulin-mCherry (red, right). Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision) and deconvolved using softWoRx software. Frames (focal planes) were collected every 2.5 s. Time compression is 37.5.



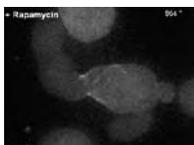
Video 5. **Localization of Utrophin-GFP and α -Tubulin-mCherry in dividing Slik-depleted S2 cells as shown in Fig. 2 C.** Dividing Slik dsRNA-depleted cell stably expressing Utrophin-GFP (GFP-UtrCH; black, left; green, right) and α -Tubulin-mCherry (red, right). Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision) and deconvolved using softWoRx software. Frames (focal planes) were collected every 2.5 s. Time compression is 37.5.



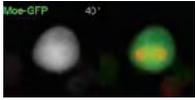
Video 6. **GFP-Tubby and RC-mRFP in interphase S2 cells as shown in Fig. 4 E.** Interphase GFP-Tubby (white, left; green, right) stable cell line transiently expressing the rapamycin constructs (RCs; red, right). Rapamycin was added after 1 min. Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision). Frames (focal planes) were collected every 15 s. Time compression is 75.



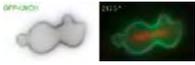
Video 7. **Moe-GFP and RC-mRFP in metaphase S2 cells as shown in Fig. 4 E.** Dividing Moe-GFP (white) stable cell line transiently expressing the RCs. Rapamycin was added after 1 min. Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision). Frames (focal planes) were collected every 10 s. Time compression is 50.



Video 8. **Moe-GFP and RC-mRFP in dividing S2 cells as shown in Fig. 4 F.** Dividing Moe-GFP (white) stable cell line transiently expressing the RCs (not depicted) treated with rapamycin. Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision) and deconvolved using softWoRx software. Frames (focal planes) were collected every 10 s. Time compression is 90.



Video 9. **Moe-GFP and α -Tubulin-mCherry in dividing Skittles-depleted S2 cells as shown in Fig. 6 D.** Dividing Skittles dsRNA-depleted cell stably expressing Moe-GFP (white, left; green, right) and α -Tubulin-mCherry (red, right). Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision). Frames (focal planes) were collected every 7 min. Time compression is 1,260.



Video 10. **Utrophin-GFP and α -Tubulin-mCherry in dividing Skittles-depleted S2 cells as shown in Fig. 2 C.** Dividing Skittles dsRNA-depleted cell stably expressing Utrophin-GFP (GFP-UtrCH; black, left; green, right) and α -Tubulin-mCherry (red, right). Images were analyzed by time-lapse microscopy using a microscope (DeltaVision). Frames (focal planes) were collected every 7.5 s. Time compression is 37.5.

DISCUSSION

Le processus mitotique est caractérisé par un intense remodelage du cortex cellulaire, conduisant à une succession de modifications morphologiques. Comment ces transformations de forme cellulaire sont spatialement et temporellement régulées durant le cycle cellulaire et plus particulièrement en mitose ? Plusieurs études ont précédemment mis en évidence que la dMoésine est requise pour la stabilité corticale [47], [63], sans que les mécanismes à l'origine de sa régulation soient pleinement identifiés. Nous avons donc cherché à identifier de nouveaux régulateurs de la dMoésine dans le processus de division cellulaire, et à mieux comprendre en quoi l'anisotropie de distribution de la dMoésine est importante pour le remodelage du cortex cellulaire. Dans cette étude, nous identifions deux réseaux de signalisation qui agissent de façon complémentaire pour réguler l'activation de la dMoésine à la fois temporellement et spatialement.

Nous trouvons premièrement que la balance entre l'activité kinase de Slik et l'activité phosphatase de Pp1-87B restreint l'activation de la dMoésine à la mitose. En plus de cette régulation temporelle, Slik et Pp1-87B participent également à la régulation spatiale de la dMoésine, en promouvant respectivement son enrichissement à l'équateur et son appauvrissement au cortex polaire. L'altération de cette régulation spatiale résulte en une instabilité corticale causée par une croissance incontrôlée des blebs lorsque la dMoésine n'est pas activée aux pôles, ou au contraire à une absence de division cellulaire associée à de la binucléation lorsque la dMoésine est suractivée aux régions polaires. Nous mettons également en évidence que le PI(4,5)P2 est nécessaire pour recruter la dMoésine au cortex cellulaire dès l'entrée en mitose, et constitue un régulateur clef de la dMoésine en contrôlant sa distribution dynamique tout au long de la division cellulaire. Enfin, nous identifions deux facteurs impliqués dans la distribution et l'activation de la dMoésine via une production localisée de PI(4,5)P2 : Skittles et Pten. En intégrant ces deux réseaux de signalisation, (i) Slik/Pp1-87B et (ii) Skittles/Pten/PI(4,5)P2, la dMoésine participe à la réorganisation dynamique du cortex cellulaire permettant le remodelage cortical des cellules mitotiques.

La balance entre l'activité kinase de Slik et l'activité phosphatase de Pp1-87B au cours du cycle cellulaire contrôle la régulation temporelle de la dMoésine.

L'activation de la dMoésine est induite par une modification conformationnelle qui lui permet de lier simultanément l'Actine filamenteuse et le PI(4,5)P2 de la membrane

plasmique, suivie d'une phosphorylation en C-terminal stabilisant la dMoésine dans cette conformation ouverte, active (cf. 422). Chez la drosophile, la phosphorylation en C-terminal est dépendante de la kinase Slik, qui est nécessaire à l'activation de la dMoésine à l'entrée en mitose [127], [128]. Nos observations montrent que cette kinase est localisée au cortex cellulaire indépendamment du cycle cellulaire, en mitose comme en interphase. Cette observation, combinée au fait qu'un traitement des cellules à la calyculine A (un inhibiteur des phosphatases de la famille PP1 et PP2A) induit une augmentation du taux de dMoésine phosphorylée, suggère que la phosphorylation de la dMoésine est également régulée par au moins une phosphatase. Bien que l'implication d'une phosphatase dans la régulation de la dMoésine soit suggérée depuis 1996 [172], nous identifions pour la première fois la phosphatase Pp1-87B comme étant nécessaire à la déphosphorylation de la dMoésine dès la fin de la mitose et en interphase.

Pour comprendre comment la balance entre l'activité kinase de Slik et l'activité phosphatase de Pp1-87B restreint l'activation de la dMoésine à la mitose, nous avons caractérisé la localisation de Pp1-87B dans des cellules mitotiques et interphasiques. Nos données montrent que contrairement à la kinase Slik, qui reste associée au cortex cellulaire durant tout le cycle, la localisation de Pp1-87B est extrêmement dynamique. Alors que Pp1-87B est majoritairement cytoplasmique et légèrement enrichi au cortex en interphase, cette phosphatase est exclue du cytoplasme à proximité de la membrane plasmique à l'entrée en division et est progressivement délocalisée sur le fuseau mitotique. Pp1-87B se relocalise ensuite sur l'ADN puis à la membrane du pont intercellulaire. Nous supposons que la phosphorylation de la dMoésine en mitose est permise par la séquestration de Pp1-87B sur des structures intracellulaires dont le fuseau mitotique et l'ADN. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si Slik et Pp1-87B sont capables de respectivement phosphoryler et déphosphoryler la dMoésine directement, ou si des intermédiaires restent à identifier.

Le couple kinase / phosphatase Slik / Pp1-87B participe également à l'anisotropie de distribution de la dMoésine en anaphase et télophase.

En plus de contrôler l'activation de la dMoésine à la transition interphase – mitose, la kinase Slik et la phosphatase Pp1-87B participent aussi à la distribution anisotrope de la dMoésine à la transition métaphase – anaphase. Plus précisément, nos données montrent que lorsque le cortex devient différentiellement contracté aux régions équatoriales et aux régions polaires en début d'anaphase, la localisation de Slik à l'équateur accentue l'enrichissement de la dMoésine à la membrane plasmique équatoriale. Au contraire, la

localisation de Pp1-87B près des régions polaires en anaphase participe à l'inactivation de la dMoésine aux pôles, probablement en raison de modifications conformationnelles successives de la dMoésine, qui cycle entre une forme fermée cytoplasmique et une forme ouverte instable car non phosphorylée. Pp1-87B étant une sous-unité catalytique, il serait intéressant d'identifier la ou les sous-unité(s) régulatrice(s) permettant de moduler (i) son activité phosphatase et/ou (ii) sa localisation dynamique à chaque phase mitotique et/ou (iii) sa spécificité/affinité envers la dMoésine. Pp1-87B étant connu par ailleurs pour réguler la condensation des chromosomes et la formation du fuseau mitotique [173], [174], l'étude plus approfondie de cette phosphatase pourrait permettre de mieux comprendre comment la morphogénèse cellulaire des cellules mitotiques par le remodelage cortical est synchronisée à la ségrégation des chromosomes. Cependant, même si le couple Slik / Pp1-87B est essentiel pour contrôler la localisation de la dMoésine, préférentiellement corticale en mitose et cytoplasmique en interphase, nos données démontrent également que durant la mitose un mécanisme supplémentaire phosphorylation-indépendant est nécessaire pour réguler spatialement la dMoésine : la liaison au PI(4,5)P2.

En produisant localement du PI(4,5)P2, Skittles et Pten régulent spatialement l'activation de la dMoésine et participent au maintien de la stabilité corticale.

Il est communément admis que l'Actine corticale est réorganisée à l'entrée en division pour promouvoir l'arrondissement cellulaire (cf. 3131), puis est progressivement délocalisée des régions polaires vers l'équateur pour permettre simultanément la relaxation polaire et la contraction équatoriale (cf. 33). Sous forme phosphorylée, c'est-à-dire en mitose, la dMoésine a la particularité de lier de façon relativement stable l'Actine filamenteuse (cf. 422). La distribution dynamique de la dMoésine de la prophase à la télophase pourrait donc potentiellement être dépendante de la réorganisation et/ou de la relocalisation de l'Actine filamenteuse des pôles vers l'équateur. Par ailleurs, la dMoésine est également capable de lier directement le PI(4,5)P2, qui comme l'Actine présente la même dynamique de localisation que la dMoésine à savoir un enrichissement à l'équateur en anaphase et au sillon de clivage en télophase. Le PI(4,5)P2 pourrait donc lui aussi être responsable de la distribution de la dMoésine, au même titre que l'Actine filamenteuse.

Afin de déterminer si la régulation spatiale de la dMoésine est contrôlée par l'Actine ou le PI(4,5)P2, nous avons dans un premier temps évalué l'importance du PI(4,5)P2 dans la localisation corticale de la dMoésine. Nos données montrent que durant la mitose, la liaison de la dMoésine au PI(4,5)P2 par son domaine Ferm est indispensable à sa localisation corticale et à sa relocalisation équatoriale à la transition métaphase-anaphase.

En effet, l'abolition de l'interaction entre la dMoésine et le PI(4,5)P2, par des mutations du domaine Ferm rendant impossible la liaison au PI(4,5)P2 [3] (cf. article 1 page 59), conduit à une relocalisation cytoplasmique de la dMoésine. Le même résultat est observé lorsque le taux de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique est réduit. De plus, une forme phosphomimétique de la dMoésine donc capable de lier l'Actine filamenteuse, et mutée pour le domaine Ferm donc incapable de lier le PI(4,5)P2, demeure cytoplasmique à l'entrée en division (donnée non montrée) suggérant que la liaison à l'Actine corticale n'est pas suffisante pour recruter la dMoésine au cortex à l'entrée en mitose. Au contraire, le domaine Ferm seul, qui lie le PI(4,5)P2, s'associe uniformément avec la membrane plasmique en prophase et métaphase puis se délocalise progressivement des régions polaires vers l'équateur en anaphase et télophase, suggérant que l'enrichissement du PI(4,5)P2 à la transition métaphase – anaphase est suffisant pour relocaliser la dMoésine des pôles vers l'équateur. Sans pouvoir exclure un rôle de l'Actine filamenteuse dans la localisation de la dMoésine, nos données démontrent que la liaison de la dMoésine à l'Actine corticale n'est pas suffisante pour localiser la dMoésine au cortex en mitose contrairement à sa liaison au PI(4,5)P2.

Afin de comprendre plus en profondeur comment l'activation et la distribution de la dMoésine sont contrôlées en mitose et plus particulièrement à la transition métaphase – anaphase, nous avons cherché à savoir comment le taux et la distribution du PI(4,5)P2 sont régulés en mitose. Par des expériences de microscopie et de biochimie, trois enzymes impliquées dans la production du PI(4,5)P2 se sont révélés être nécessaires à la stabilité corticale des cellules mitotiques : CG10260, Skittles et Pten. Ces deux dernières sont les enzymes majeures de production du PI(4,5)P2, et ont une dynamique de localisation similaire à celle du PI(4,5)P2. En effet, celles-ci présentent une distribution uniforme en prophase et métaphase suivie d'une relocalisation progressive et partielle des régions polaires vers l'équateur en anaphase et télophase. Ayant préalablement démontré (i) que l'activation et la localisation membranaire de la dMoésine sont indispensables à la stabilité corticale des cellules mitotiques, (ii) que ce recrutement membranaire est induit par une liaison au PI(4,5)P2 et (iii) que Skittles et Pten sont les deux enzymes majeures de production du PI(4,5)P2, nous pensons que l'instabilité corticale observée suite à l'inhibition de chacune de ces deux enzymes est liée à un défaut d'activation et/ou de recrutement de la dMoésine. Cette hypothèse est confirmée par un taux de dMoésine phosphorylée réduit et un recrutement membranaire diminué lorsque Pten ou Skittles n'est plus exprimée. Skittles et Pten participent donc à la stabilité corticale des cellules mitotiques via une production localisée de PI(4,5)P2, impliquée simultanément dans l'activation et la distribution de la dMoésine.

Par quel(s) mécanisme(s) Pten s'enrichit à l'équateur en anaphase et au sillon de clivage en télophase ? La distribution de Pten en mitose a précédemment été observée chez *D.discoideum*, révélant une accumulation à l'équateur en anaphase et télophase [175]. Chez la drosophile, Pten présente la même dynamique de localisation, suggérant des mécanismes de régulation conservés au cours de l'évolution. Il semblerait que la localisation membranaire de Pten soit en partie dépendante d'une liaison au PI(4,5)P2 via son domaine PH [176]. En effet, une déphosphorylation rapide du PI(4,5)P2 se traduit par une relocalisation cytoplasmique de Pten (résultat non montré). Ces observations suggèrent l'existence d'une boucle de régulation, l'enrichissement du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique équatoriale favorisant le recrutement de Pten préférentiellement à l'équateur, amplifiant ainsi l'enrichissement du PI(4,5)P2 par une déphosphorylation du PI(3,4,5)P3 particulièrement au cortex équatorial. Par ailleurs, une autre étude effectuée sur des cellules humaines (leucocytes et cellules de rein) met en évidence que Pten constitue une cible de la Rho-kinase [177]. Il serait intéressant d'élucider plus en détail la contribution de ces différents mécanismes dans la localisation et l'activation de Pten spécifiquement dans les cellules mitotiques.

De la même façon, des expériences supplémentaires devraient être menées pour identifier les mécanismes régulant la distribution de Skittles, qui ne semble pas être dépendante du PI(4,5)P2 dans les cellules de drosophile. En effet, la déphosphorylation rapide du PI(4,5)P2 n'altère en rien la localisation corticale de Skittles (résultat non montré). Plusieurs études démontrent que la localisation et l'activation des PI4P 5-kinases (orthologues de Skittles) peuvent être dépendantes de la GTPase Rho et de la Rho-kinase [178], [179], [180] [181], connues pour être préférentiellement activées à l'équateur en anaphase. Ces données, combinées à nos observations, conduisent à un modèle selon lequel à la transition métaphase – anaphase le transport de la RhoGEF Pebble par des kinésines sur les microtubules astraux qui contactent le cortex à l'équateur favorise l'activation de la GTPase Rho1 préférentiellement au cortex équatorial (cf. 3312). Rho pourrait ensuite recruter et/ou activer Skittles (et/ou Pten ?) préférentiellement à l'équateur, dont le domaine kinase permet la phosphorylation du PI4P en PI(4,5)P2. Des études supplémentaires devront être effectuées pour déterminer le rôle précis des GTPases de la famille Rho et/ou d'autres molécules de signalisation dans la distribution de Skittles en mitose et plus particulièrement à la transition métaphase – anaphase. Si les localisations de Skittles et de Pten dépendent effectivement de la GTPase Rho, cela suggérerait que l'enrichissement du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique équatoriale (et donc de toutes les protéines de la machinerie du sillon régulées par le PI(4,5)P2 dont la dMoésine) est déterminé au moins en partie par le fuseau mitotique.

L'activation de la dMoésine à l'entrée en mitose participe à l'arrondissement cellulaire et au maintien de la stabilité corticale.

Au sein des tissus, *in vivo*, la morphologie des cellules peut être très variable. Or une morphologie irrégulière des cellules mitotiques pourraient conduire à une hétérogénéité des signaux entre microtubules et cortex, à l'origine d'une mauvaise orientation du fuseau mitotique (cf.312). L'arrondissement des cellules à l'entrée en division semble donc critique au bon déroulement de la division, en permettant peut-être au fuseau mitotique d'avoir suffisamment d'espace pour se positionner correctement dans une architecture cellulaire invariable (sphérique) quelque soit le type de cellule en division. De nombreuses études ont démontré que la réorganisation du cytosquelette d'Actine à l'entrée en division est à l'origine de l'arrondissement cellulaire (cf. 3131). Par ailleurs, nos travaux ainsi que des études précédentes mettent en évidence que l'activation de la dMoésine est absolument nécessaire pour permettre aux cellules d'acquérir une forme sphérique et un cortex contractile à l'entrée en division [63] [47], sans que les mécanismes moléculaires impliqués soient pour autant identifiés. Des mesures faites avec un microscope à force atomique indiquent que l'augmentation de la rigidité corticale à l'entrée en mitose est défectueuse dans les cellules déplétées en dMoésine [47]. Ce phénotype est reversé par l'expression de la forme phosphomimétique de la dMoésine, mais pas par l'expression de la forme non phosphorylable. L'inhibition de Slik, qui phosphoryle la dMoésine, résulte dans le même phénotype, suggérant que la forme active de la dMoésine, phosphorylée, est essentielle à l'augmentation de la rigidité corticale en mitose [47] [63]. Comment l'activation de la dMoésine induit-elle un arrondissement cellulaire et une augmentation de la rigidité corticale ? Plusieurs hypothèses non exclusives permettent d'expliquer ces observations.

Premièrement, sous forme active, la dMoésine pourrait promouvoir de façon directe la rigidité corticale et l'arrondissement cellulaire en réorganisant l'association de l'Actine filamenteuse à la membrane plasmique. En effet, des études en microscopie électronique montrent qu'à l'entrée en division les filaments d'Actine sont orientés parallèlement à la membrane plasmique. L'activation de la dMoésine en début de mitose pourrait provoquer l'alignement des microfilaments d'Actine parallèlement à la membrane, permettant la mise en place d'un réseau cortical aux propriétés physiques modifiées, éventuellement plus rigide. Dans le cadre de notre étude, des projections en trois dimensions obtenues sur des cellules mitotiques marquées pour l'Actine filamenteuse et exprimant des formes sauvage ou phosphomimétique de la dMoésine-GFP montrent que la dMoésine n'est pas uniformément répartie au cortex contrairement à ce que l'on pourrait croire en observant des plans focaux, mais forme des structures filamenteuses qui colocalisent avec les filaments d'Actine (résultat

non montré). Ayant par ailleurs montré que ces filaments d'Actine corticaux ne sont pas suffisants pour recruter la dMoésine à l'entrée en division, il se pourrait que ce soit la distribution « filamenteuse » de la dMoésine qui participe à l'organisation de l'Actine corticale. Dans un premier temps, il pourrait donc être intéressant d'observer si en prophase également la distribution de la dMoésine conduit à ces structures filamenteuses, et si celles-ci colocalisent avec les filaments d'Actine. Afin de déterminer si l'activation de la dMoésine suffit à réorganiser l'Actine corticale à l'entrée en division, il serait intéressant de comparer différents paramètres tels que l'orientation, la longueur ou encore la densité des filaments d'Actine (i) dans des cellules en interphase et en prophase exprimant la forme sauvage de la dMoésine, (ii) dans des cellules en interphase et en prophase exprimant la forme non phosphorylable (inactivable) de la dMoésine, et (iii) dans des cellules interphasiques exprimant la forme phosphomimétique (constitutivement active) de la dMoésine.

Deuxièmement, de par sa faculté à lier simultanément le PI(4,5)P₂ de la membrane plasmique et l'Actine filamenteuse, l'activation de la dMoésine pourrait promouvoir la rigidité corticale et l'arrondissement cellulaire par une augmentation de l'adhérence entre le cytosquelette d'Actine et la membrane plasmique qui sont les deux constituants majoritaires du cortex.

Troisièmement, la petite GTPase Rho1 (RhoA chez les mammifères) est également connue pour être impliquée dans les modifications morphologiques des cellules à l'entrée en mitose ainsi que dans la contractilité du cortex, de par sa capacité à réorganiser le cytosquelette d'Actine (cf. 3132). Or il a été montré que le domaine N-terminal de la Radixine (une des trois ERMs exprimées chez les mammifères) est capable d'interagir avec la Rho-GEF Dbl ainsi qu'avec une Rho-GDI, et que la liaison de ce domaine à la Rho-GDI a pour conséquence de libérer la Rho-GEF Dbl [182]. En séquestrant un inhibiteur de Rho, la Rho-GDI, et en libérant un activateur de Rho, Dbl, les ERMs dont la dMoésine pourraient également participer à la morphogénèse mitotique et réguler la contractilité corticale en favorisant l'activation de la GTPase Rho sur l'ensemble du cortex en début de division. Il serait intéressant de savoir si l'expression d'une forme phosphomimétique de la dMoésine dans des cellules interphasiques se traduit par une activation ectopique de la GTPase Rho. Si tel n'est pas le cas, l'activation de la dMoésine pourrait suffire à l'arrondissement cellulaire et à l'augmentation de la rigidité corticale par une réorganisation de l'Actine indépendamment de la GTPase Rho, expliquant éventuellement pourquoi Rho ne semble pas essentielle à l'arrondissement de certains types cellulaires à l'entrée en mitose.

L'anisotropie de distribution de la dMoésine (équateur versus pôles) permet un différentiel de plasticité corticale nécessaire à l'élongation cellulaire en anaphase.

La relocalisation progressive de l'Actine des régions polaires vers l'équateur est indispensable à la contraction équatoriale et à la relaxation polaire (cf. 33), cette brisure de symétrie corticale étant essentielle à l'élongation des cellules en anaphase et à la division cellulaire. En effet, il semblerait que l'élongation permise par la relaxation des pôles soit importante pour dissiper l'excès de tension exercé par le cytoplasme sur la membrane plasmique, en raison de la contraction de l'anneau d'actomyosine à l'équateur [183]. Sans cette élongation, la pression intracellulaire, excessive, ne permettrait pas à l'anneau d'Actomyosine de se contracter totalement, conduisant à la régression de l'anneau et à la formation de cellules binucléées [183]. Notre étude montre que l'inactivation de la dMoésine aux pôles est requise pour permettre l'élongation cellulaire et l'intégrité du processus mitotique, la suractivation de la dMoésine aux pôles entraînant un défaut d'élongation associé à de la binucléation. Nous pensons que la suractivation de la dMoésine aux pôles conduit à une excessive rigidité du cortex polaire. Peu de données sont disponibles sur les mécanismes à l'origine de l'élongation cellulaire en anaphase, cependant une étude démontre que l'inhibition de la Rho-kinase conduit à un défaut d'élongation cellulaire induite justement par une excessive rigidité corticale (cf. 32) [66]. En raison de ce cortex trop rigide et de l'absence d'élongation cellulaire, le fuseau mitotique ne peut s'allonger correctement et les deux lots de chromosomes se retrouvent plaqués contre la membrane plasmique. Il est intéressant de noter que la même observation est obtenue dans les cellules exprimant la forme phosphomimétique de la dMoésine (résultat non montré), suggérant que le défaut d'élongation cellulaire observé est le résultat d'un cortex polaire excessivement rigide plutôt que d'un défaut d'allongement du fuseau mitotique. Il serait intéressant de confirmer ces observations sur un nombre plus conséquent de cellules anaphasiques, et de tester si l'ajout de latrunculine en faible concentration pour « assouplir » préférentiellement le cortex polaire reverse (partiellement) le défaut d'élongation des cellules présentant une suractivation de la dMoésine aux pôles.

Notre étude met également en évidence que la distribution anisotropique de la dMoésine en anaphase participe à la relocalisation progressive de l'Actine corticale des pôles vers l'équateur. En effet, la sur-association de la dMoésine à la membrane plasmique polaire se traduit par une excessive densité d'Actine filamenteuse aux pôles. Il serait particulièrement intéressant de déterminer si cet excès de filaments d'Actine est le résultat (i) d'une trop forte adhérence entre le cytosquelette d'Actine et la membrane plasmique

bloquant l'éventuel flux d'Actine corticale des pôles vers l'équateur, ou (ii) d'une altération de la communication entre les microtubules du fuseau mitotique et le cortex.

Premièrement, plusieurs études proposent que l'enrichissement de l'Actine à l'équateur en anaphase n'est pas uniquement dû à la synthèse de nouveaux filaments d'Actine à l'équateur, mais serait induit au moins en partie par un flux de filaments d'Actine déjà formés des pôles vers l'équateur (cf. 332) [184], [86], [98, 99], [185]. Si un tel flux existe dans les cellules de drosophile lors de l'anaphase, et si ce flux contribue de façon significative à l'enrichissement de l'Actine à l'équateur, alors la sur-activation de la dMoésine aux pôles pourrait bloquer ce flux à cause d'une adhérence trop forte entre la membrane plasmique polaire et le cytosquelette d'Actine. Il serait intéressant d'effectuer des expériences afin de déterminer la contribution respective de ces deux processus dans l'enrichissement de l'Actine à l'équateur dans les cellules S2, et d'identifier parmi ces processus lequel ou lesquels sont altéré(s) quand la dMoésine est suractivée aux pôles. En condition sauvage, si l'assemblage de nouveaux filaments d'Actine à l'équateur est le processus majoritaire alors l'injection d'Actine globulaire marquée à un fluorochrome juste avant la contraction équatoriale, c'est-à-dire durant l'anaphase A, devrait conduire à une forte concentration du fluorochrome à l'équateur. Au contraire, l'injection de phalloïdine couplée à un fluorochrome bien avant la contraction équatoriale, en métaphase par exemple, ne devrait pas conduire à un enrichissement du fluorochrome à l'équateur lors de la formation de l'anneau d'Actomyosine. Si la relocalisation de filaments d'Actine pré-existants est le processus majeur par lequel l'Actine s'enrichit à l'équateur, des résultats contraires sont attendus. Ces différentes hypothèses ne sont bien entendu pas exclusives.

Deuxièmement, il est possible que la densité excessive des filaments d'Actine aux pôles ne soit pas induite par un blocage du flux cortical d'Actine, mais soit le fruit d'une communication dérégulée entre le fuseau mitotique et le cortex. En effet, la longueur des microtubules astraux semble dérégulée suite à l'inhibition de la dMoésine [63], et plusieurs études suggèrent que les ERMs peuvent moduler la stabilité des microtubules [186], [187]. Or la dynamique des microtubules est particulièrement importante pour signaler la contraction et/ou la relaxation du cortex en mitose (cf. 3313), et la contraction équatoriale chez la drosophile semble particulièrement dépendante des microtubules astraux (cf. 3312). Il se pourrait que l'excessive stabilité des microtubules astraux qui contactent le cortex polaire se traduise par la perte des signaux dits « négatifs », ou permette une activation ectopique de protéines favorisant la contractilité corticale telle que Rho. Il pourrait donc être judicieux d'observer la localisation de Pebble ou de Rho dans des cellules anaphasiques exprimant la forme phosphomimétique de la dMoésine, et d'évaluer si ces protéines sont

bien concentrées dans une zone équatoriale restreinte ou anormalement localisées aux régions polaires.

L'ensemble de ces expériences nous permettrait de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels la distribution anisotrope de la dMoésine permet l'élongation cellulaire, un processus de remodelage cortical essentiel à la morphogénèse cellulaire des cellules mitotiques et à l'intégrité de la division cellulaire.

Par ailleurs, en anaphase, la dMoésine est enrichie à la membrane plasmique équatoriale où le cortex est contracté, et au contraire est appauvrie des régions polaires où le cortex est moins contractile. La fonction la mieux connue de la dMoésine consistant à lier la membrane plasmique au cytosquelette sous-jacent, il serait intéressant d'évaluer si ce lien fonctionnel entre contractilité corticale et association membrane plasmique – cytosquelette d'actine se traduit au niveau moléculaire par une interaction directe entre dMoésine et Myosine II. Bien qu'actuellement aucune étude ne mette en évidence une liaison entre la dMoésine et les chaînes légères ou lourdes de la Myosine II, ces protéines ont la caractéristique de présenter au moins un régulateur en commun, la phosphatase Pp1-87B. La localisation de Pp1-87B sur l'ADN à proximité des régions polaires en anaphase pourrait donc participer à la relaxation corticale des pôles en favorisant (i) une diminution de la contractilité via l'inactivation de la chaîne légère de la Myosine II (par déphosphorylation de la Myosine Phosphatase, cible de Pp1-87B), et (ii) une diminution de l'association membrane – cytosquelette d'actine via l'inactivation partielle de la dMoésine (par déphosphorylation de la thréonine 559).

De plus, le fait que Pp1-87B puisse inactiver simultanément la dMoésine et la Myosine II suggère que les défauts de division cellulaire observés suite à l'inhibition de Pp1-87B, notamment le fort pourcentage de binucléation, peuvent au moins partiellement être induits par une suractivation de la Myosine II aux pôles des cellules anaphasiques. Pour discriminer les anomalies de division cellulaire inhérentes à la suractivation de la dMoésine de celles inhérentes à la dérégulation d'autres protéines dont la Myosine II, il aurait été judicieux d'inhiber Pp1-87B dans des cellules déplétées en dMoésine ou exprimant la forme non phosphorylable de la dMoésine, ou encore d'inhiber la kinase Slik en plus de Pp1-87B (même si la dMoésine ne constitue pas l'unique cible Slik).

Les blebs : des protrusions furtives et transitoires potentiellement impliquées dans l'élongation cellulaire et le positionnement du fuseau mitotique.

Similairement à l'étude de Prothero de 1968, qui démontre que l'activité maximale de blebbing se produit quand le sillon est à demi contracté [102], nous observons dans les cellules S2 sauvages que durant la progression anaphasique, un ou deux blebs de petite taille apparaissent aux pôles quand le cortex se contracte à l'équateur. Malgré plusieurs études effectuées sur les blebs en interphase (cf. 333), nos connaissances sur les blebs mitotiques ont faiblement progressé. En effet, en raison de leur petite taille et surtout de leur rapide rétraction, les mécanismes physiques et moléculaires qui induisent la formation et la rétraction des blebs en mitose sont difficiles à analyser. Cette difficulté est renforcée par le fait que la fixation au paraformaldéhyde ne permet pas de conserver les blebs en formation, seuls les blebs en rétraction riches en filaments d'Actine peuvent être visualisés. Or le temps de demi-vie des blebs en rétraction est extrêmement court. Grâce à l'évolution des microscopes et des techniques de microscopie, dont la mise au point de sondes permettant de suivre la dynamique de l'Actine filamenteuse en Live, nous pouvons désormais disséquer en détail les mécanismes de formation et de rétraction des blebs qui se produisent lors de l'anaphase. En faisant des acquisitions rapprochées, de l'ordre de toutes les six à sept secondes, nos données montrent que le recrutement transitoire de la dMoésine au cortex des blebs est essentiel à leur rétraction, en permettant un recrutement homogène des filaments d'Actine. La déplétion de la dMoésine ou de ses activateurs, Slik, Skittles ou Pten, conduit à un recrutement hétérogène de l'Actine au cortex des blebs, incompatible avec leur rétraction.

Plus qu'une simple conséquence d'instabilité corticale, il semblerait que ces blebs aient un rôle fonctionnel lors de la division cellulaire. En effet, nos expériences de time-lapse montrent qu'en condition sauvage, les blebs ne sont pas seulement rétractés mais en partie « englobés », « intégrés » par la cellule qui semble croître aux pôles en partie grâce à ces blebs. Ces observations suggèrent que les blebs polaires facilitent l'élongation cellulaire en anaphase, en participant à la relaxation corticale des pôles dépourvus transitoirement d'actine filamenteuse. D'autre part, une étude récente effectuée par l'équipe de L.Wordeman confère aux blebs mitotiques un rôle clef dans le positionnement du fuseau mitotique [107]. Au vu de cette étude, il me semblerait particulièrement intéressant d'approfondir le rôle potentiel des blebs mitotiques dans le positionnement du fuseau, en comparant le centrage et la dynamique de celui-ci dans des cellules sauvages et des cellules déplétées en dMoésine, Slik, Skittles ou Pten qui présentent toutes (i) une croissance dérégulée des blebs polaires qui ne sont pas correctement rétractés et (ii) un décentrage du fuseau.

L'activation de la dMoésine participe à l'orientation du fuseau mitotique.

Plusieurs études effectuées *in cellulo* s'accordent sur le fait que l'activation de la dMoésine en mitose est importante pour l'orientation du fuseau mitotique. En effet, son inhibition par l'utilisation d'un dsRNA conduit fréquemment à des défauts d'orientation du fuseau qui subit une rotation sur lui-même de la métaphase à l'anaphase, ainsi qu'à des défauts de positionnement caractérisés par un fuseau mitotique excentré [63] [47]. Nos données confirment cette observation et mettent en évidence un rôle supplémentaire du PI(4,5)P2 dans le processus mitotique, à travers le positionnement du fuseau. En effet, suite à l'inhibition de Skittles ou de Pten, nous observons similairement aux cellules déplétées en dMoésine un fuseau excentré, suggérant que la quantité de PI(4,5)P2 en mitose est particulièrement importante pour le positionnement du fuseau probablement via l'activation de la dMoésine (entre autres). Comment l'activation de la dMoésine participe à la localisation et à la stabilisation du fuseau mitotique ? Plusieurs mécanismes non exclusifs peuvent être impliqués dans ce processus, impliquant (i) un contrôle direct de la dMoésine sur le fuseau mitotique via une liaison aux microtubules, et/ou (ii) un effet indirect via une modification des propriétés physiques de l'Actine corticale (ou sub-corticale).

(i) Les ERMs peuvent potentiellement contrôler directement la localisation du fuseau. Il est possible que la dMoésine puisse stabiliser l'ancrage des microtubules astraux au cortex en liant simultanément la membrane plasmique, les filaments d'Actine corticaux et les microtubules, participant ainsi à l'orientation et au centrage du fuseau mitotique. Cette hypothèse est soutenue par le fait que la Radixine est capable de se lier aux microtubules [188], [189], que l'Ezrine semble être une protéine associée aux microtubules dans différents types cellulaires [189], [190], et enfin que la dMoésine colocalise partiellement avec le fuseau mitotique [191]. D'autre part, plusieurs études suggèrent que l'Ezrine et la Moésine participent à la régulation de la dynamique des microtubules [186], [187]. L'activation de la dMoésine sauvage à l'entrée en division pourrait donc participer à l'orientation du fuseau mitotique, via une modulation de l'instabilité dynamique des microtubules astraux ou de leur liaison avec le cortex. Bien que le(s) mécanisme(s) par lesquels la dMoésine stabilise les microtubules ne soient pas encore identifiés, nous pouvons imaginer que la fixation de la dMoésine aux microtubules puisse recruter des régulateurs de la dynamique microtubulaire (cf. 223), ou encore modifier la conformation de la Tubuline stabilisant la structure des microtubules (cf. 222)

(ii) Les ERMs peuvent potentiellement contrôler indirectement la localisation du fuseau. En plus de ces actions directes, il est également possible que la dMoésine contrôle

l'orientation et la position du fuseau indirectement, via l'organisation de l'Actine corticale et non via une liaison aux microtubules. Pour savoir si les défauts de localisation et d'orientation du fuseau observés en absence de dMoésine sont induits par une altération de la rigidité corticale ou si la dMoésine joue un rôle direct sur le fuseau mitotique, l'équipe de B.Baum a restauré la rigidité corticale dans des cellules S2R+ déplétées en dMoésine par un traitement à la concanavaline A qui lie les glycoprotéines de la membrane plasmique [47]. Remarquablement, ce traitement réduit les défauts du fuseau, suggérant que le rôle primaire de la dMoésine en mitose est de réguler la rigidité corticale. Un cortex rigide et bien sphérique servirait au positionnement et à la stabilisation du fuseau via des interactions avec les microtubules astraux.

Cette hypothèse est soutenue par une autre étude, récente, effectuée *in vivo* chez la souris [192]. Suite à l'inhibition du facteur de transcription Srf dans des cellules épidermiques, l'activation des protéines ERMs est défectueuse et ces cellules ne sont plus capables de s'arrondir correctement à l'entrée en division ni d'orienter correctement leur fuseau mitotique. Bien que d'autres protéines soient dérégulées suite à l'inhibition de Srf, leur modèle suggère que les défauts corticaux induits par l'activation défectueuse des protéines ERMs sont à l'origine de la mauvaise localisation des protéines LGN et NuMA. Or NuMA est capable de se lier directement aux microtubules [193], et participe au positionnement du fuseau mitotique en connectant les microtubules astraux au cortex des cellules via une interaction avec le complexe Dynéine/Dynactine [194], [195], [196], [33], [32]. La liaison de NuMA aux microtubules est par ailleurs régulée par la protéine LGN [197], connue également pour participer à l'orientation du fuseau mitotique [198]. Dans le cadre de notre étude, il serait intéressant de comparer la localisation des protéines Mud (l'orthologue de NuMA chez la drosophile [199]) et Pins (l'orthologue de LGN chez la drosophile [200]) dans les cellules en culture S2 sauvages et suite à l'inhibition de la dMoésine, de Slik, de Skittles ou encore de Pten.

L'orientation anormale du fuseau mitotique pourrait également être induite par une altération du cortex d'Actine lors du processus de dé-adhésion. En effet, lorsque les cellules entrent en division, l'arrondissement cortical n'est pas intégral, en raison de fibres de rétraction qui persistent et maintiennent une légère adhésion au substrat (cf. 312). Ces fibres de rétraction sont particulièrement importantes pour l'orientation du fuseau mitotique, en régulant localement la mise sous tension des microtubules astraux via une interaction entre l'Actine corticale et des protéines motrices ou avec des agrégats d'Actine sub-corticale (cf. 312). Or il a été précédemment montré que l'Ezrine, le plus proche orthologue de la dMoésine exprimée chez les mammifères, se localise sur l'ensemble du cortex et s'enrichit

sur ces fibres de rétraction à l'entrée en mitose [52]. Par ailleurs, l'inhibition de la dMoésine induit également une réduction de la taille du fuseau mitotique [63], suggérant que les microtubules astraux sont sous tension et que les pôles du fuseau sont poussés vers le cortex dans des conditions normales. Ces tensions sur les microtubules peuvent induire un mouvement du fuseau seulement si le cortex est suffisamment rigide pour résister à la tension exercée aux extrémités des autres microtubules. En absence de dMoésine, il se pourrait que la taille réduite et le décentrage du fuseau soient induits par des tensions sur les microtubules insuffisantes ou irrégulièrement réparties en raison d'un cortex d'Actine aux propriétés physiques altérées incluant une dérégulation du nombre ou de la fonctionnalité des fibres de rétraction. L'instabilité du fuseau mitotique due à l'inactivation de la dMoésine pourrait donc être le fruit d'une fragilisation des connections entre microtubules astraux et Actine corticale (ou sub-corticale).

La stabilisation différentielle de la dMoésine au cortex des blebs et à la membrane équatoriale pourrait participer à la modulation de la contractilité corticale, persistante à l'équateur et transitoire aux blebs polaires.

Nous montrons que durant l'anaphase, l'anisotropie de distribution de la dMoésine, c'est-à-dire l'enrichissement à l'équateur et l'appauvrissement aux pôles, est essentielle pour permettre l'élongation cellulaire et la cytokinèse. Loin d'être un processus aussi simple, la dMoésine doit également être capable de s'associer transitoirement avec la membrane polaire pour maintenir la stabilité corticale. Dans le cas contraire, la réorganisation et/ou le recrutement des filaments d'Actine au cortex des blebs ne permet pas leur rétraction. De plus, nous mettons en évidence que si le recrutement de la dMoésine au cortex équatorial et au cortex des blebs est dépendant de la liaison au PI(4,5)P₂, la kinase Slik participe à l'enrichissement de la dMoésine à l'équateur sans pour autant être nécessaire, contrairement au cortex des blebs où Slik est indispensable pour stabiliser l'association de la dMoésine avec la membrane plasmique. Ce résultat suggère que les mécanismes de régulation de la dMoésine à l'équateur et au cortex des blebs sont légèrement différents. Nous pouvons supposer que l'enrichissement du PI(4,5)P₂ à la membrane plasmique équatoriale fait de Slik un activateur qui améliore la localisation corticale de la dMoésine en stabilisant sa forme ouverte, sans pour autant être indispensable. Au contraire, l'absence d'enrichissement du PI(4,5)P₂ à la membrane des blebs fait probablement de Slik un activateur essentiel pour maintenir l'association de la dMoésine avec le PI(4,5)P₂, grâce à la stabilisation de sa conformation ouverte phosphorylation-dépendante.

Un avantage de l'existence de ces deux processus de régulation de la dMoésine pour la cellule est peut-être la capacité à créer simultanément un cortex contractile de « longue durée » à l'équateur, et au contraire une réponse transitoire et furtive aux pôles. D'autre part, le PI(4,5)P2 peut moduler la dynamique de l'Actine de plusieurs façon en recrutant ou séquestrant de nombreux régulateurs de l'Actine (cf. 53). Pour cette raison, un enrichissement de PI(4,5)P2 au cortex des blebs afin de recruter la dMoésine pourrait altérer l'anisotropie de distribution de l'Actine en favorisant sa synthèse aux pôles en plus de l'équateur. A l'inverse, nous connaissons peu de substrats de Slik et l'inhibition de cette kinase conduit exactement aux mêmes phénotypes, qualitativement et quantitativement parlant, que l'inhibition de la dMoésine. Plutôt que d'enrichir le PI(4,5)P2 au cortex des blebs, le recrutement de la kinase Slik pourrait être un mécanisme de régulation plus spécifique de la dMoésine même si nous ne pouvons exclure un recrutement et/ou une phosphorylation d'autres cibles de Slik tel que Merlin.

En quoi la régulation temporelle de la dMoésine au cours du cycle cellulaire, c'est-à-dire son activation en mitose et son inactivation en interphase, est-elle importante pour réguler le remodelage cortical ?

Alors que les cellules de drosophile S2 ont un cortex relativement souple en interphase, l'entrée en mitose est corrélée à l'acquisition d'une forme parfaitement sphérique associée à une augmentation de la rigidité corticale. L'expression d'une forme constitutivement active de la dMoésine dans des cellules non mitotiques est suffisante pour induire une rigidification corticale, comme le montrent les tensions mesurées par microscopie à force atomique [47]. Notre présente étude confirme que l'inactivation de la dMoésine en interphase est nécessaire pour permettre la relaxation corticale, et met de plus en évidence que cette inactivation dès la fin de la division est dépendante de la phosphatase Pp1-87B. Or bien que la contractilité et la forme sphérique du cortex soient des paramètres physiques importants à l'intégrité de la division cellulaire, en contrôlant notamment l'orientation du fuseau (cf. 312), il est probable que la relaxation corticale en interphase soit également nécessaire à de nombreux processus physiologiques nécessitant une modification morphologique des cellules. Plus précisément, la migration cellulaire nécessite un différentiel de plasticité corticale entre différentes zones de la cellule (trailing edge et leading edge), difficilement conciliable avec un cortex uniformément rigidifié ou contracté. Il est intéressant de noter que les ERMs ne sont pas uniformément associées au cortex dans les lymphocytes en migration mais restreintes au trailing edge [201], [202]. De même, la localisation restreinte des protéines ERMs au pôle apical des entérocytes et des cellules de l'oreille interne est importante pour la mise en place de structures polarisées riches en

Actine filamenteuse telles que les microvillosités ou les stéréocils, qui sont critiques pour respectivement l'absorption intestinale et l'audition (cf. 43). Ce large spectre d'action des protéines ERMs dans la polarité corticale pourrait expliquer pourquoi l'inhibition des trois ERMs chez les mammifères ou de l'unique représentant chez la drosophile ou *C.elegans* n'est pas compatible avec la survie des organismes. En conclusion, il semblerait que la dMoésine et les protéines ERMs en général soient des facteurs clés du remodelage cortical, pas seulement dans le cadre de la division mais dans de nombreux processus nécessitant des modifications morphologiques ou la mise en place d'une polarité cellulaire. Une meilleure caractérisation des mécanismes régulateurs et de la fonctionnalité des ERMs en mitose pourrait avoir des retombées intéressantes sur la compréhension de leur implication dans la morphogénèse cellulaire en général, et mettre en avant l'importance de leur régulation temporelle au cours du cycle cellulaire pour le développement et la survie des organismes.

III.

**En contrôlant l'homéostasie du PI(4,5)P₂,
dOcr1 favorise la contraction équatoriale
et participe ainsi à la morphogénèse cellulaire
des cellules mitotiques.**

RESUME

En mitose, la contraction de l'anneau d'Actomyosine est responsable du clivage de la cellule mère en deux cellules filles. L'enrichissement du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique équatoriale joue un rôle important dans ce processus, en recrutant et/ou régulant des protéines essentielles au maintien et à la contraction de cet anneau (cf.53). Malgré l'importance de ce phosphoinositide dans le processus de division cellulaire, les mécanismes qui permettent de réguler sa distribution ou sa production en mitose ne sont que partiellement caractérisés.

Cette étude identifie la protéine dOcr1 comme un nouveau régulateur du PI(4,5)P2, qui en réduisant le taux de PI(4,5)P2 endomembranaire est responsable de son enrichissement à la membrane plasmique. De par sa localisation sur les endosomes précoces, tardifs et de recyclage et son activité 5-phosphatase, notre étude suggère que dOcr1 contribue à l'homéostasie du PI(4,5)P2 en déphosphorylant le pool de PI(4,5)P2 présent sur les vésicules intracellulaires.

De plus, nos travaux mettent en évidence qu'une localisation ectopique de PI(4,5)P2 sur des endomembranes est suffisante pour induire une délocalisation partielle de l'Actomyosine, constituée d'Actine filamenteuse et de Myosine, de la GTPase Rho, un régulateur clef de la contractilité de l'Actomyosine, ou encore de l'Anilline. Cette redistribution de la machinerie du sillon est incompatible avec le clivage de la cellule mère, conduisant à un pourcentage élevé de cellules aneuploïdes. La protéine dOcr1 est donc nécessaire à la cytokinèse, en régulant la distribution du PI(4,5)P2 et indirectement celle de l'Actomyosine.

Enfin, chez l'homme, la mutation de Ocr1, qui constitue avec Inpp5B les deux orthologues de dOcr1, conduit au syndrome de Lowe. Cette maladie génétique est caractérisée par différents signes cliniques affectant entre autres la vision, le fonctionnement des reins et le développement du cerveau. Les causes moléculaires à l'origine de cette pathologie n'étant toujours pas identifiées, notre étude suggère que des défauts de division cellulaire pourraient contribuer au dysfonctionnement ou au développement anormal de ces organes.

The Inositol 5-Phosphatase dOCRL Controls PI(4,5)P2 Homeostasis and Is Necessary for Cytokinesis

Khaled Ben El Kadhi,¹ Chantal Roubinet,^{1,3} Sara Solinet,¹ Grégory Emery,^{1,2} and Sébastien Carréno^{1,2,*}

¹Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC)

²Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire
Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

³CNRS, UMR5547, Centre de Biologie du Développement,
F-31062 Toulouse, France

Summary

During cytokinesis, constriction of an equatorial actomyosin ring physically separates the two daughter cells. At the cleavage furrow, the phosphoinositide PI(4,5)P2 plays an important role by recruiting and regulating essential proteins of the cytokinesis machinery [1]. Accordingly, perturbation of PI(4,5)P2 regulation leads to abortive furrowing and binucleation [2–4]. To determine how PI(4,5)P2 is regulated during cytokinesis, we individually knocked down each of the enzymes controlling the phosphoinositide (PIP) cycle in *Drosophila*. We show that depletion of the *Drosophila* ortholog of human oculocerebrorenal syndrome of Lowe 1 (OCRL1), an inositol 5-phosphatase mutated in the X-linked disorder oculocerebrorenal Lowe syndrome, triggers a high rate of cytokinesis failure. In absence of dOCRL, several essential components of the cleavage furrow were found to be incorrectly localized on giant cytoplasmic vacuoles rich in PI(4,5)P2 and in endocytic markers. We demonstrate that dOCRL is associated with endosomes and that it dephosphorylates PI(4,5)P2 on internal membranes to restrict this phosphoinositide at the plasma membrane and thereby regulates cleavage furrow formation and ingression. Identification of dOCRL as essential for cell division may be important to understand the molecular basis of the phenotypic manifestations of Lowe syndrome.

Results and Discussion

dOCRL, the *Drosophila* Ortholog of OCRL1, Is Required for Cell Division

To identify which of the enzymes controlling the PI(4,5)P2 cycle are essential for cytokinesis, we individually depleted the 34 *Drosophila* putative kinases (13), phosphatases (16), and phospholipases (5) that directly or indirectly regulate PI(4,5)P2 levels, and we recorded cell divisions in an α -tubulin-GFP *Drosophila* S2 cell line [5]. Among these enzymes, inactivation of CG9115 and CG3573 led to a significant increase in cytokinesis failure (see Figures S1A and S1C available online). Whereas the myotubularin CG9115 has already been implicated in cell-cycle progression [6], we report here the first evidence that the inositol 5-phosphatase CG3573 is important for cytokinesis. The cytokinesis defects observed in the absence of CG3573 function correlated with the appearance of giant multinucleated cells, with cells that can reach ten times the size of control cells (Figure 1A).

The CG3573 gene encodes a protein of 850 amino acids that we named dOCRL after one of its two human orthologs, OCRL1 (oculocerebrorenal syndrome of Lowe 1) (Figure S1B). dOCRL comprises an inositol polyphosphate 5-phosphatase catalytic domain (IPP) and a C-terminal RhoGAP-like domain that is catalytically inactive in both dOCRL human orthologs [7]. Mutations in OCRL1 are responsible for Lowe syndrome, a rare X-linked disorder seen in ~1 in 200,000 births and for some cases of Dent disease [8, 9]. The cellular function of OCRL1 is poorly characterized; it has been proposed to modulate membrane traffic [10], actin dynamics [11], and/or Pi(4,5)P2 homeostasis [12]. Because investigation of OCRL1 functions is hampered by functional redundancy between OCRL1 and INPP5B in mammals [13], we further analyzed the function of its *Drosophila* ortholog in cultured cells. The polyploidy phenotype was specific to dOCRL knockdown because two additional independent double-stranded RNAs (dsRNAs) (dOCRL dsRNA2 and dOCRL dsRNA 5'UTR) triggered cytokinesis failure in S2 cells (Figure 1B). We then performed a rescue experiment by stably expressing an mCherry-dOCRL, a GFP-dOCRL, or a GFP-dOCRL phosphatase-dead cDNA that are not targeted by the dOCRL 5'UTR dsRNA. Although dOCRL constructs restored efficiency of cytokinesis to levels seen in nontreated cells, the phosphatase-dead mutant was not able to rescue cytokinesis defects (Figure 1B; Figure S1D). These results demonstrate that dOCRL is necessary for cytokinesis via its inositol 5-phosphatase enzymatic activity.

dOCRL Is Associated with Endocytic Compartments

We took advantage of the fact that dOCRL fused to GFP or mCherry was functional (Figure 1B) to investigate the subcellular localization of the enzyme. Besides a diffuse staining in the cytoplasm, dOCRL was associated with cytoplasmic vesicles, visualized as dot-like or ring-like structures (Figure 2A). We further found that GFP-dOCRL partially colocalized with the small GTPase Rab5, a marker of early endosomes (Figure 2A; 17.5% of dOCRL vesicles were positive for Rab5). Because dOCRL was also present on vesicles that were not positive for Rab5, we explored the potential association of dOCRL with endosomes of other origin. We cotransfected mCherry-dOCRL with GFP-Rab7 or YFP-Rab11 [14] and found that dOCRL was also associated with these markers of late and recycling endosomes (Figure 2A; 62.3% and 53.5% of dOCRL vesicles were positive for Rab7 and Rab11, respectively), indicating that similarly to its human orthologs, dOCRL is associated with endosomes of diverse origins [15–17]. Remarkably, when dOCRL was depleted, Rab5, Rab7, and Rab11 were present on giant abnormal vacuoles rarely seen in control cells (Figure 2B), showing that in the absence of dOCRL, the endocytic compartments are disorganized.

dOCRL Controls PI(4,5)P2 Homeostasis

Because the preferential substrate of the inositol 5-phosphatase OCRL1 is the phosphate at the 5' position of PI(4,5)P2 [18], we analyzed the distribution of PI(4,5)P2 upon dOCRL depletion using GFP-Tubby or mCherry-PH^{PLC δ} as PI(4,5)P2 biosensors [19]. In control and in dOCRL knockdown cells, PI(4,5)P2 was associated with the plasma membrane

*Correspondence: sebastien.carreno@umontreal.ca

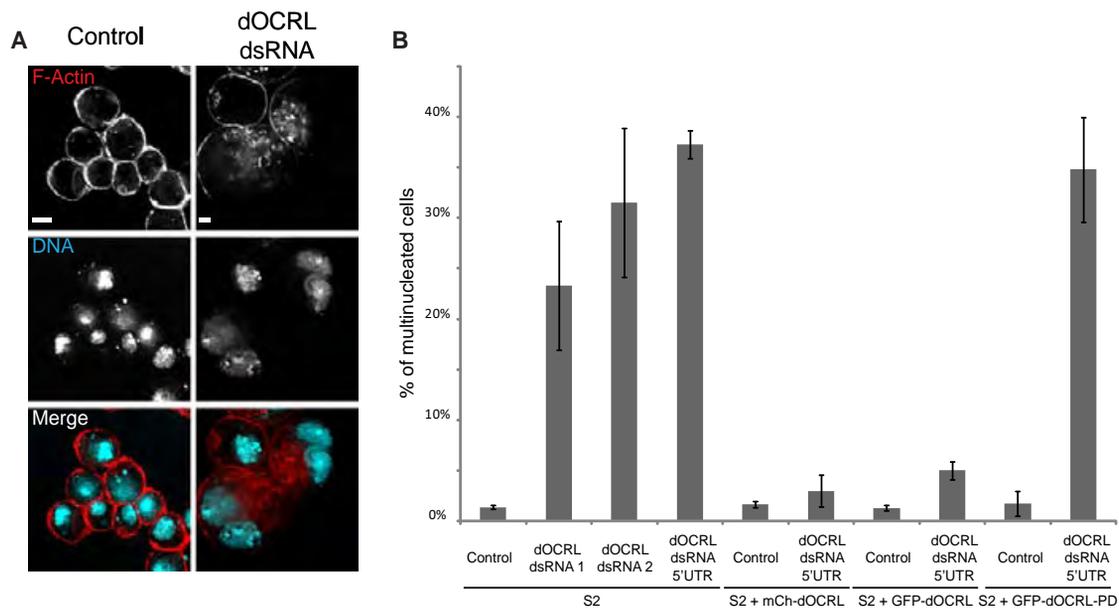


Figure 1. dOCRL Is Required for Cytokinesis in *Drosophila* S2 Cells

(A) Control or dOCRL-depleted cells were labeled for F-actin (red) and DNA (blue). dOCRL-depleted cells are multinucleated and significantly larger than controls. 27.8% of the dOCRL-depleted cell population was more than twice as large as the mean area of control cells (vs. 0.47% of the control population); n = 1522 dOCRL-depleted cells, n = 633 controls.

(B) S2 cells or S2 cells stably expressing the indicated dOCRL constructs were treated by the indicated dsRNA and scored for polyploidy (minimum of three independent experiments, error bar represents standard deviation (SD), a minimum of 1500 cells per condition were scored). Scale bar represents 5 μ m.

(Figure 2C; Figure S2A). Strikingly, we found that PI(4,5)P2 accumulated on the abnormal vacuoles observed in dOCRL knockdown cells. To test whether dOCRL depletion modifies PI(4,5)P2 homeostasis, we monitored GFP-Tubby or mCherry-PH^{PLC δ} fluorescence and quantified the ratio of signal associated with endomembranes to that associated with the plasma membrane. We measured a significant increase of the ratio of PI(4,5)P2 localized on endomembranes to that associated with the plasma membrane when dOCRL was depleted when compared to control cells (Figure 2D; Figure S2B). This defect of PI(4,5)P2 homeostasis was rescued when mCherry-dOCRL was expressed in absence of endogenous dOCRL (Figure 2D). These results indicate that dOCRL controls PI(4,5)P2 enrichment on the plasma membrane by dephosphorylating PI(4,5)P2 on endomembranes.

dOCRL Is Required for Proper Furrowing of the Contractile Ring

During cytokinesis, PI(4,5)P2 accumulates at the contractile ring of mammalian cells while it furrows [2, 4]. Furthermore, a tight control of PI(4,5)P2 levels at the cortex of dividing cells is important to maintain cleavage furrow stability and cytokinesis efficiency [2, 3, 20]. We therefore investigated whether dOCRL depletion can impinge on PI(4,5)P2 mitotic distribution and cleavage furrow stability (Figure 3A; Movie S1; Movie S2). Whereas in control cells PI(4,5)P2 was enriched at the cleavage furrow, this accumulation was deficient upon dOCRL depletion (Figure 3A; Figure S3A). We measured that in control conditions, enrichment of PI(4,5)P2 at the equatorial cleavage furrow was progressive and occurred when cells advanced from metaphase to telophase. Interestingly, we found a similar progressive increase of PI(4,5)P2 associated with endomembranes when dOCRL-depleted cells went from metaphase to telophase (Figure 3A; Figure S3B). This shows

that the PI(4,5)P2-rich endomembranes observed in dOCRL-depleted cells share similarity with the plasma membrane of the cleavage furrow.

Because PI(4,5)P2 plays a key role in controlling actin dynamics [21], we then asked whether PI(4,5)P2 deregulation could impinge on filamentous actin (F-actin) organization. In control telophase cells, F-actin was mainly cortical and was enriched at the cleavage furrow. Although F-actin was enriched at the cleavage furrow of dOCRL-depleted cells, it also abnormally accumulated on the PI(4,5)P2-rich endomembranes (Figure S3C). We then assessed the dynamics of F-actin in mitotic cells stably expressing GFP-utrophin as a F-actin reporter [22] (Figure 3B). We used the equatorial enrichment of GFP-utrophin fluorescence to mark the longitudinal width of the contractile ring. In control cells, contractile rings occupied an average of 12.5% of the cell length, whereas in dOCRL-depleted cells, the contractile rings were twice as broad (Figure S3D). This indicates that dOCRL function is necessary to spatially constrain the contractile ring. Similarly to fixed conditions, we measured a significant defect in F-actin homeostasis during cell division with a high level of F-actin fluorescence at the surface of the endomembranes (Figure S3E). These results establish that dOCRL is necessary for stabilization of the contractile ring and suggest that the furrowing deficiency observed upon dOCRL depletion occurs through defective homeostasis of PI(4,5)P2 and F-actin.

dOCRL Is Required for the Proper Assembly of Components of the Cytokinetic Machinery

We then asked whether, similarly to F-actin, other components of the cytokinetic machinery were also mistargeted to the endomembrane surface instead of accumulating solely at the cytokinetic ring. During furrowing, signals sent at the equator by the mitotic spindle trigger actomyosin contractions by

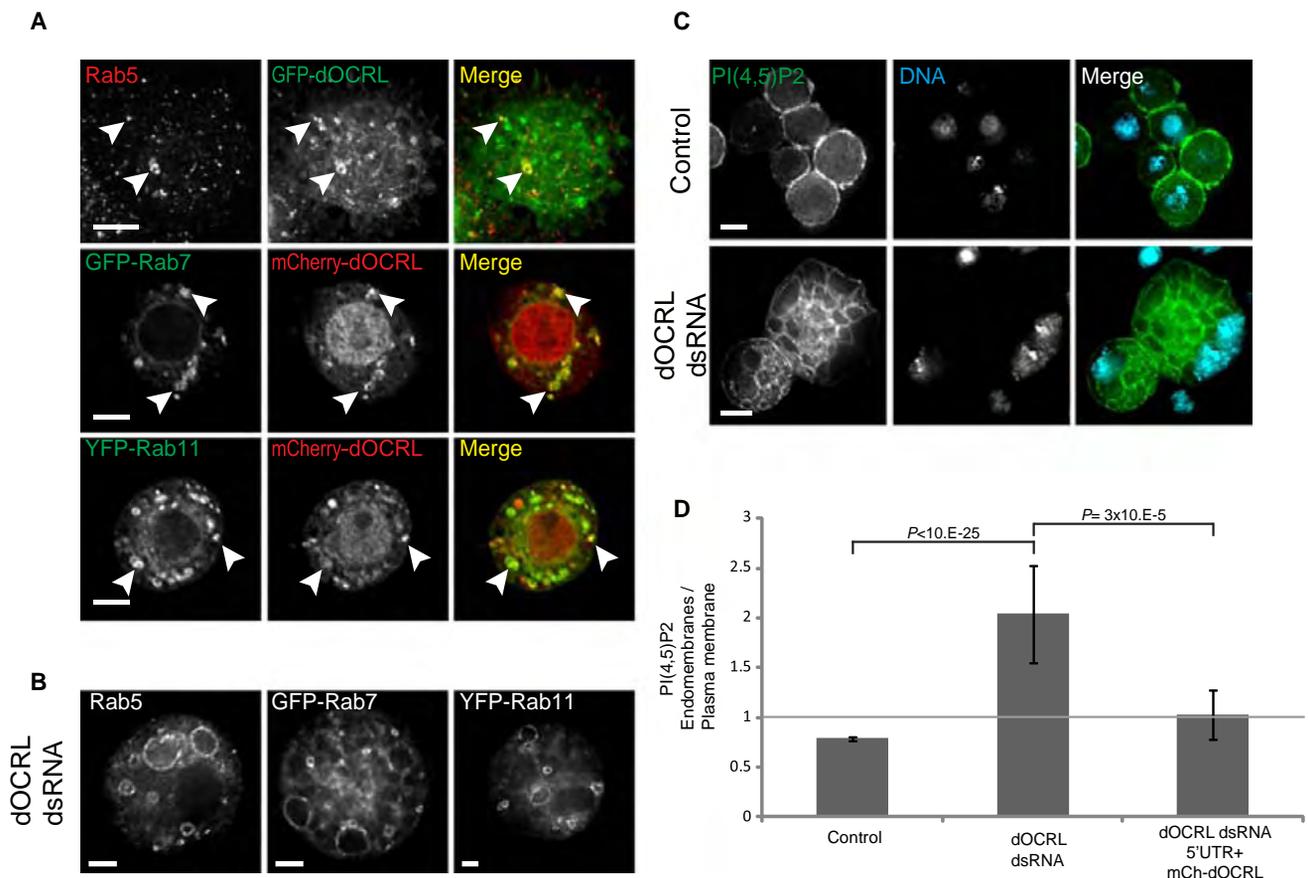


Figure 2. dOCRL Is Localized on Endocytic Compartments and Controls PI(4,5)P2 Homeostasis

(A) S2 cells expressing GFP-dOCRL (green) were immunostained for Rab5 (red) and labeled for DNA (blue). Cells coexpressing mCherry-dOCRL (red) with GFP-Rab7 or YFP-Rab11 (green) were labeled for DNA (blue). Arrows show colocalization of the indicated proteins on endosomes. (B) dOCRL-depleted cells were either immunostained for Rab5 or transiently transfected by GFP-Rab7 or YFP-Rab11. (C) Control or dOCRL-depleted cells stably expressing GFP-Tubby (green) as a marker of PI(4,5)P2 were labeled for DNA (blue). 56.6% \pm 13.7% of dOCRL-depleted cells presented PI(4,5)P2 intracellular vacuoles versus 5.6% \pm 1.9% of control cells; n = 350. (D) The ratio of GFP-Tubby fluorescence associated with endomembranes to that associated with the plasma membrane was measured using ImageJ on fixed cells (minimum of two independent experiments, error bar represents SD). Scale bar represents 5 μ m.

locally activating the small GTPase RhoA [23, 24]. In turn, RhoA drives polymerization of F-actin and activation of myosin II to generate the forces necessary for ingression of the cleavage furrow. While in control cells, RhoA accumulated at the cytokinetic ring; when dOCRL was depleted, RhoA was mistargeted to endomembranes (Figure 4A). This shows that dOCRL is necessary to correctly localize RhoA during cytokinesis. Interestingly, PI(4,5)P2 was shown to play an important role in concentrating RhoA at the division site of budding yeast [25].

We then monitored cell division in S2 cells stably expressing mCherry-anillin and the regulatory light chain of myosin II, Sqh-GFP (Figure 4B; Movie S3; Movie S4) [26]. These two proteins are essential components of the cytokinetic machinery and their individual depletion promotes a high rate of cytokinesis failure [27–29]. Whereas myosin II is essential for actomyosin contractions, anillin is a multidomain protein capable of scaffolding different components of the cytokinetic ring at the plasma membrane [30, 31]. As previously reported [26, 32], anillin was nuclear in control interphase cells, became uniformly cortical in metaphase, and accumulated at the cytokinetic ring in anaphase (Figure 4B; Figure S4A). myosin II was mostly cytoplasmic in interphase and was evenly distributed at the metaphase cortex and

enriched at the cleavage furrow (Figure 4B; Figure S4B). In dOCRL-depleted cells, we found that myosin II and anillin were mistargeted to the abnormal giant vacuoles during cell division. Similarly to PI(4,5)P2, we measured that association of anillin and myosin II with endomembranes increased when dOCRL-depleted cells progressed from metaphase to telophase (Figures S4A and S4B). Together, these results show that contractile ring components are aberrantly recruited to the PI(4,5)P2-enriched endomembranes when function of dOCRL is impaired. This further implies that dOCRL and PI(4,5)P2 are required to specify the molecular distinction between the cytokinetic ring membrane and endomembranes.

The spatial restriction of specific phosphoinositides on different cellular membranes contributes to membrane structural heterogeneity. The majority of PI(4,5)P2 is concentrated at the plasma membrane; however, the mechanisms controlling PI(4,5)P2 homeostasis remain mysterious. Our studies identify the *Drosophila* ortholog of the human inositol 5-phosphatases OCRL1 and INPP5B as essential for PI(4,5)P2 homeostasis.

We propose that in wild-type conditions, dOCRL dephosphorylates PI(4,5)P2 on membranes of the endocytic compartment to reduce PI(4,5)P2 intracellular levels. Depletion of

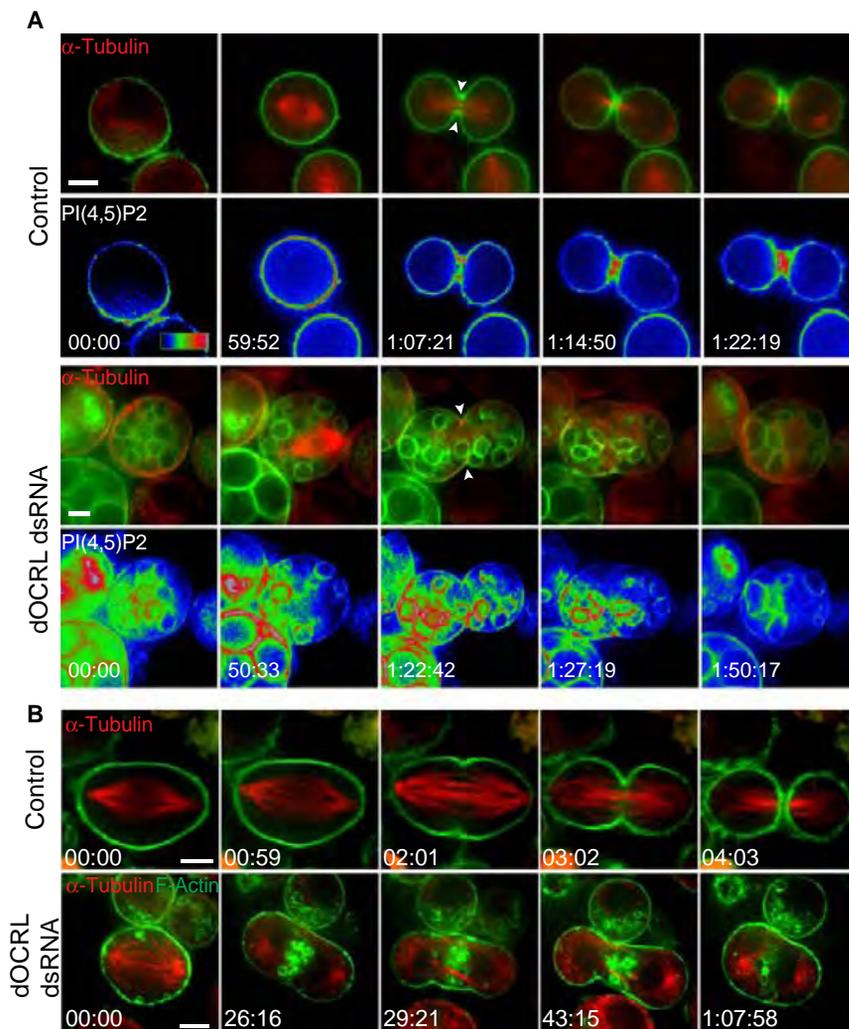


Figure 3. dOCRL Is Required for Cleavage Furrow Positioning and Stabilization

(A) Selected frames of dividing control or dOCRL-depleted cells expressing the PI(4,5)P2 biosensor GFP-Tubby (green) and α -tubulin-mCherry (red). GFP-Tubby was pseudocolored in a rainbow heatmap to underline variations in its levels (lower rows). (B) Selected frames of dividing control or dOCRL-depleted cells stably expressing utrophin-GFP (green) and α -tubulin-mCherry (red). Scale bar represents 5 μ m.

dOCRL leads to a defect in PI(4,5)P2 homeostasis with a net increase of this phosphoinositide on endomembranes. During cell division, enrichment of PI(4,5)P2 at the plasma membrane of the cytokinesis ring is critical for the stability of the furrow. In dOCRL-depleted cells, defects in cytokinesis could arise through at least two distinct mechanisms. One possibility is that accumulation of F-actin, RhoA, myosin II, and anillin on vacuoles of endocytic origin reflects a natural trafficking process that transports cytokinetic machinery elements to the furrow [33]. In that model, PI(4,5)P2 homeostasis and dOCRL function are necessary to regulate the trafficking and fusion of endosomes carrying cytokinetic machinery elements to the cleavage furrow. Alternatively, defects in PI(4,5)P2 homeostasis directly trigger mislocalization of key components of the cytokinetic machinery to intracellular membranes at the expense of the cortical cleavage furrow. In that model, progressive enrichment of PI(4,5)P2 at the cleavage furrow represents a spatial cue that helps specify recruitment and localization of the cytokinetic machinery components. In accordance with this model, we found a progressive enrichment of PI(4,5)P2, anillin, and myosin II at the surface of the abnormal endomembranes while dOCRL-depleted cells progressed from metaphase to telophase. These two models are not mutually exclusive and could operate in concert to

control cytokinesis. The importance of dOCRL for PI(4,5)P2 homeostasis, endocytic compartment specification, and cytokinesis may also be relevant to understand how mutations in OCRL1 produce the phenotypic manifestation of the Lowe syndrome.

Supplemental Information

Supplemental Information includes four figures, Supplemental Experimental Procedures, and four movies and can be found with this article online at [doi:10.1016/j.cub.2011.05.030](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.030).

Acknowledgments

We are grateful to F. Payre, in whose lab this project was initiated. We are also grateful to G. Hickson, M. Gonzales-Gaitan, T. Balla, and A. Kiger for cell lines and DNA clones. We thank all laboratory members for their continuous help and G. Hickson and P. Roux for critical reading and comments on the manuscript. K.B.E.K. is a recipient of IRIC, UdeM, and Canadian Institutes of Health Research scholarships. C.R. is a recipient of fellowships from Ministère de la Recherche et de l'Éducation Supérieure, Fondation Lavoisier, European Molecular Biology Organization, and Association pour la Recherche contre le Cancer. G.E. is a recipient of a Tier II Canada Research Chair in Vesicular Transport and Cell Signalling. S.C. is a recipient of a Fonds de la Recherche en Santé du Québec Junior 1. This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (S.C., MOP-89877; G.E., MOP-84515).

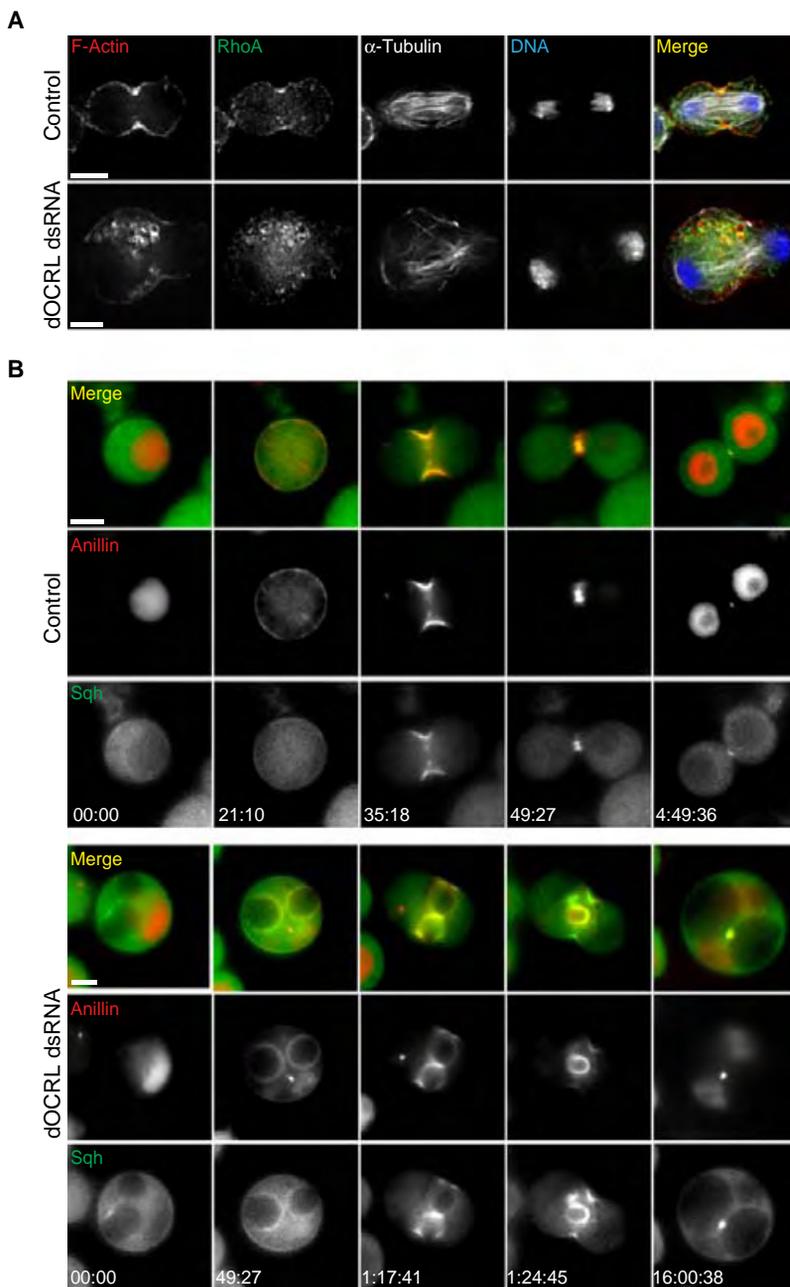


Figure 4. dOCRL Function Is Required to Localize the Cytokinetic Ring at the Equatorial Cortex

(A) Control or dOCRL-depleted cells were labeled for F-actin (red), RhoA (green), α -tubulin (white in merge channel), and DNA (blue).

(B) Selected cells frames of dividing control or dOCRL-depleted cells stably expressing anillin-mCherry (red) and Sqh-GFP (green). Scale bar represents 5 μ m.

Received: January 6, 2011
Revised: April 7, 2011
Accepted: May 16, 2011
Published online: June 9, 2011

References

- Janetopoulos, C., and Devreotes, P. (2006). Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis. *J. Cell Biol.* 174, 485–490.
- Field, S.J., Madson, N., Kerr, M.L., Galbraith, K.A., Kennedy, C.E., Tahiliani, M., Wilkins, A., and Cantley, L.C. (2005). PtdIns(4,5)P₂ functions at the cleavage furrow during cytokinesis. *Curr. Biol.* 15, 1407–1412.
- Wong, R., Hadjiyanni, I., Wei, H.C., Polevoy, G., McBride, R., Sem, K.P., and Brill, J.A. (2005). PIP₂ hydrolysis and calcium release are required for cytokinesis in *Drosophila* spermatocytes. *Curr. Biol.* 15, 1401–1406.
- Emoto, K., Inadome, H., Kanaho, Y., Narumiya, S., and Umeda, M. (2005). Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 280, 37901–37907.
- Carreno, S., Kouranti, I., Glusman, E.S., Fuller, M.T., Echard, A., and Payre, F. (2008). Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J. Cell Biol.* 180, 739–746.
- Chen, F., Archambault, V., Kar, A., Lio', P., D'Avino, P.P., Sinka, R., Lilley, K., Laue, E.D., Deak, P., Capalbo, L., and Glover, D.M. (2007). Multiple protein phosphatases are required for mitosis in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 17, 293–303.
- Lichter-Konecki, U., Farber, L.W., Cronin, J.S., Suchy, S.F., and Nussbaum, R.L. (2006). The effect of missense mutations in the RhoGAP-homology domain on ocr1 function. *Mol. Genet. Metab.* 89, 121–128.

8. Lowe, M. (2005). Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic* 6, 711–719.
9. McCrea, H.J., and De Camilli, P. (2009). Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease. *Physiology (Bethesda)* 24, 8–16.
10. Choudhury, R., Diao, A., Zhang, F., Eisenberg, E., Saint-Pol, A., Williams, C., Konstantakopoulos, A., Lucocq, J., Johannes, L., Rabouille, C., et al. (2005). Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Mol. Biol. Cell* 16, 3467–3479.
11. Suchy, S.F., and Nussbaum, R.L. (2002). The deficiency of PIP2 5-phosphatase in Lowe syndrome affects actin polymerization. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 1420–1427.
12. Zhang, X., Hartz, P.A., Philip, E., Racusen, L.C., and Majerus, P.W. (1998). Cell lines from kidney proximal tubules of a patient with Lowe syndrome lack OCRL inositol polyphosphate 5-phosphatase and accumulate phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273, 1574–1582.
13. Bernard, D.J., and Nussbaum, R.L. (2010). X-inactivation analysis of embryonic lethality in *Ocr1 wt^{-/-}; Inpp5b^{-/-}* mice. *Mamm. Genome* 21, 186–194.
14. Emery, G., Hutterer, A., Berdnik, D., Mayer, B., Wirtz-Peitz, F., Gaitan, M.G., and Knoblich, J.A. (2005). Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system. *Cell* 122, 763–773.
15. Olivos-Glander, I.M., Jänne, P.A., and Nussbaum, R.L. (1995). The oculocerebrorenal syndrome gene product is a 105-kD protein localized to the Golgi complex. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 817–823.
16. Shin, H.W., Hayashi, M., Christoforidis, S., Lacas-Gervais, S., Hoepfner, S., Wenk, M.R., Modregger, J., Uttenweiler-Joseph, S., Wilm, M., Nystuen, A., et al. (2005). An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J. Cell Biol.* 170, 607–618.
17. Ungewickell, A., Ward, M.E., Ungewickell, E., and Majerus, P.W. (2004). The inositol polyphosphate 5-phosphatase *Ocr1* associates with endosomes that are partially coated with clathrin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 13501–13506.
18. Schmid, A.C., Wise, H.M., Mitchell, C.A., Nussbaum, R., and Woscholski, R. (2004). Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation. *FEBS Lett.* 576, 9–13.
19. Szentpetery, Z., Balla, A., Kim, Y.J., Lemmon, M.A., and Balla, T. (2009). Live cell imaging with protein domains capable of recognizing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; a comparative study. *BMC Cell Biol.* 10, 67.
20. Brill, J.A., Hime, G.R., Scharer-Schuksz, M., and Fuller, M.T. (2000). A phospholipid kinase regulates actin organization and intercellular bridge formation during germline cytokinesis. *Development* 127, 3855–3864.
21. Saarikangas, J., Zhao, H., and Lappalainen, P. (2010). Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol. Rev.* 90, 259–289.
22. Burkel, B.M., von Dassow, G., and Bement, W.M. (2007). Versatile fluorescent probes for actin filaments based on the actin-binding domain of utrophin. *Cell Motil. Cytoskeleton* 64, 822–832.
23. Kishi, K., Sasaki, T., Kuroda, S., Itoh, T., and Takai, Y. (1993). Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI). *J. Cell Biol.* 120, 1187–1195.
24. Drechsel, D.N., Hyman, A.A., Hall, A., and Glotzer, M. (1997). A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos. *Curr. Biol.* 7, 12–23.
25. Yoshida, S., Bartolini, S., and Pellman, D. (2009). Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev.* 23, 810–823.
26. Hickson, G.R., and O'Farrell, P.H. (2008). Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis. *J. Cell Biol.* 180, 285–294.
27. Echard, A., Hickson, G.R., Foley, E., and O'Farrell, P.H. (2004). Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen. *Curr. Biol.* 14, 1685–1693.
28. Giansanti, M.G., Bonaccorsi, S., and Gatti, M. (1999). The role of anillin in meiotic cytokinesis of *Drosophila* males. *J. Cell Sci.* 112, 2323–2334.
29. Oegema, K., Savoian, M.S., Mitchison, T.J., and Field, C.M. (2000). Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis. *J. Cell Biol.* 150, 539–552.
30. Hickson, G.R., and O'Farrell, P.H. (2008). Anillin: A pivotal organizer of the cytokinetic machinery. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 439–441.
31. Piekny, A.J., and Maddox, A.S. (2010). The myriad roles of anillin during cytokinesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 881–891.
32. Field, C.M., and Alberts, B.M. (1995). Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex. *J. Cell Biol.* 131, 165–178.
33. Albertson, R., Cao, J., Hsieh, T.S., and Sullivan, W. (2008). Vesicles and actin are targeted to the cleavage furrow via furrow microtubules and the central spindle. *J. Cell Biol.* 181, 777–790.

Current Biology, Volume 21

Supplemental Information

The Inositol 5-Phosphatase dOCRL

Controls PI(4,5)P2 Homeostasis

and Is Necessary for Cytokinesis

Khaled Ben El Kadhi, Chantal Roubinet, Sara Solinet, Grégory Emery, and Sébastien Carréno

Supplemental Inventory

1. Supplemental Figures and Movies

Figure S1, related to Figure 1

Figure S2, related to Figure 2

Figure S3, related to Figure 3

Figure S4, related to Figure 4

Movie S1, related to Figure 3A (see separate .avi file)

Movie S2, related to Figure 3A (see separate .avi file)

Movie S3, related to Figure 4B (see separate .avi file)

Movie S4, related to Figure 4B (see separate .avi file)

2. Supplemental Experimental Procedures

3. Supplemental References

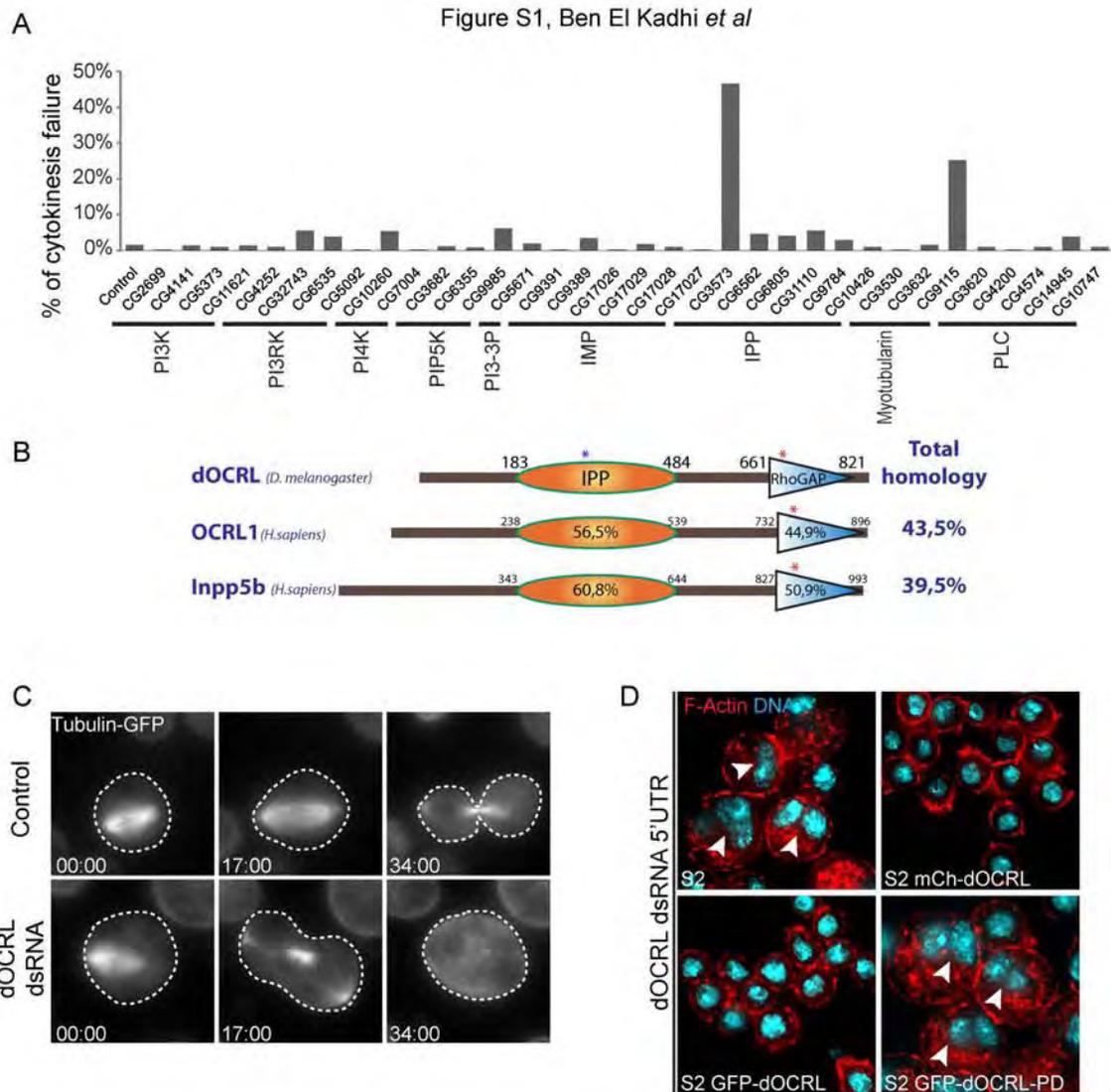


Figure S1, Related to Figure 1.

(A) α -Tubulin-GFP cells were treated for 6 days with the indicated dsRNA and divisions were recorded by live microscopy. A minimum of 50 divisions/condition was scored for cytokinesis failure.

(B) Sequence homology between *Drosophila* dOCRL and human OCRL1 and INPP5B: These proteins encompass an N-terminal inositol polyphosphate 5-phosphatase catalytic domain (IPP) and a C-terminal RhoGAP-like domain catalytically inactive where the Rho-GAP critical catalytic arginine residue is absent (red star). Blue star marks a point mutation (G365E) leading to a phosphatase dead (PD) mutant.

(C) Selected frames of control or dOCRL depleted α -Tubulin-GFP cells undergoing cell division.

(D) S2 cells or S2 cells stably expressing the indicated dOCRL constructs missing the UTR regions, were treated by a dOCRL dsRNA 5'UTR, fixed and labelled for filamentous actin (red) and DNA (blue). Arrows show multinucleated cells.

Figure S2, Ben El Kadhi *et al*

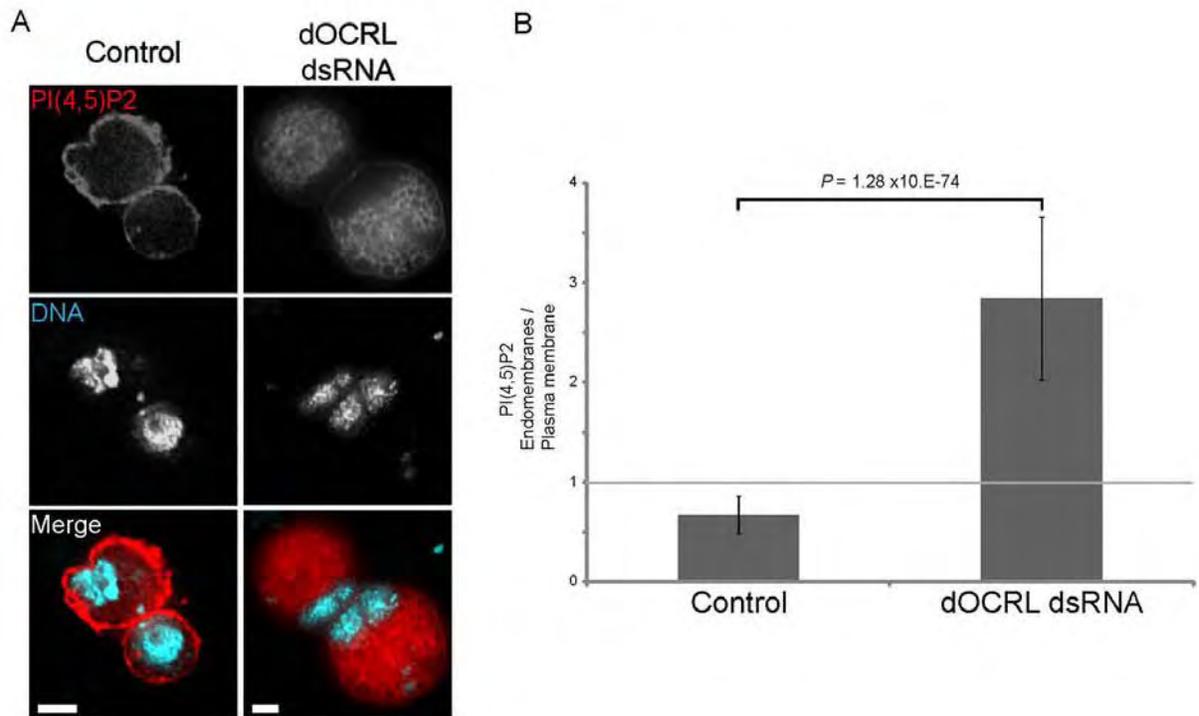


Figure S2, Related to Figure 2.

(A) Control or dOCRL depleted cells expressing mCherry-PH^{PLC δ} (red) as a marker of PI(4,5)P2 were labelled for DNA (blue).

(B) The ratio of mCherry-PH^{PLC δ} fluorescence associated with endomembranes to that associated with the plasma membrane was measured using image J on fixed cells (minimum of 2 independent experiments, error bar represents SD). Bar represents 5 μ m.

Figure S3, Ben El Kadhi *et al*

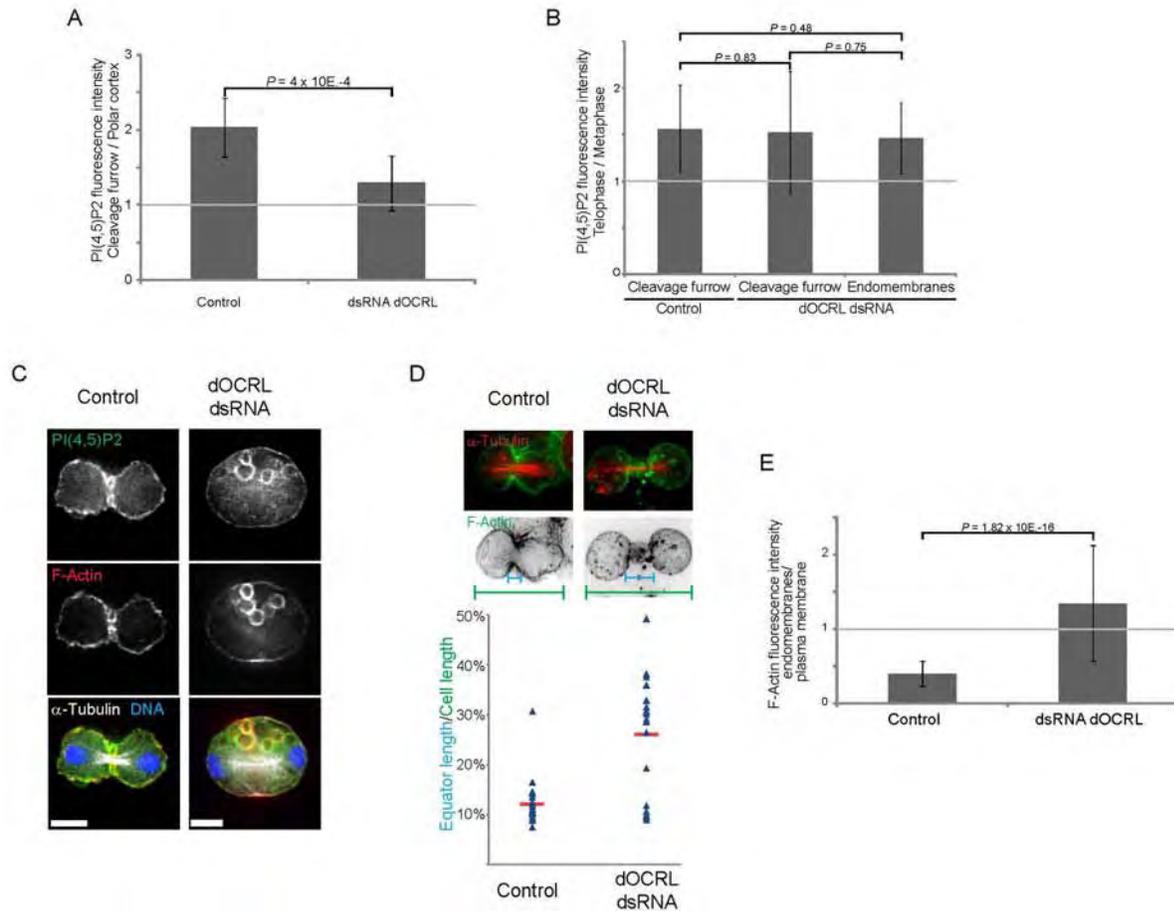


Figure S3, Related to Figure 3.

(A and B) Divisions of control or dOCRL depleted cells stably expressing Tubby-GFP as a PI(4,5)P2 reporter were recorded by time lapse microscopy. Tubby-GFP fluorescence was quantified with image J: (A) shows ratio of signal associated with the cleavage furrow to that associated with the polar cortex (2 independent experiments, error bar represents SD). (B) shows the telophase / metaphase ratio of Tubby-GFP fluorescence intensity associated with the cleavage furrow or with endomembranes (2 independent experiments, error bar represents SD).

(C) Control or dOCRL depleted Tubby-GFP (green) cells were labelled for F-actin (red), DNA (blue), α -Tubulin (white in the merge panel). Actin filaments are assembled on the abnormal PI(4,5)P2 vacuoles observed in dOCRL depleted cells.

(D) Equator length to cell length ratios, mean value is represented by a red bar, each blue triangle represents the calculated value for one cell recorded by time-lapse microscopy ($n=18$, $p\text{-value}=3.9.10E-5$). Upper panels: Selected snapshots of dividing control or dOCRL depleted cells stably expressing Utrophin-GFP (green) and α -Tubulin-mCherry (red). Lower panels show maximum projection of the Utrophin-GFP channel (inverted gray scale).

(E) Divisions of control or dOCRL depleted Utrophin-GFP S2 cells were recorded by fluorescence microscopy. The ratio of Utrophin-GFP fluorescence associated with endomembranes to that associated with the plasma membrane was measured using Image J, (3 independent experiments, error bar represents SD).

Figure S4, Ben El Kadhi *et al*

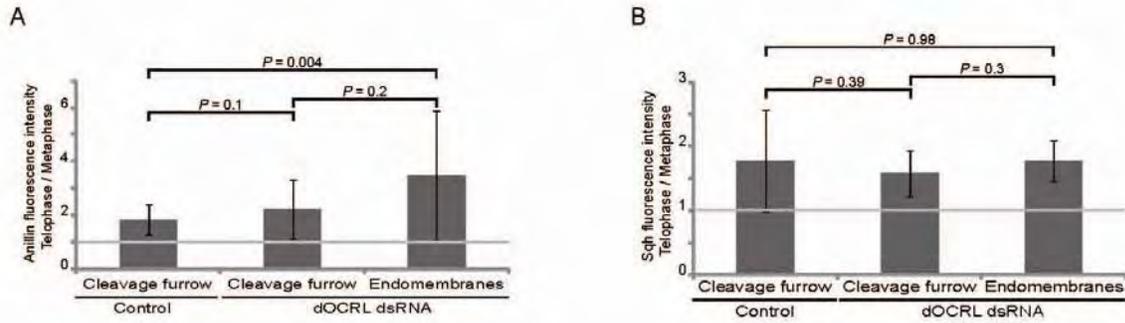


Figure S4, Related to Figure 4.

Divisions of control or dOCRL depleted cells stably expressing Sqh-GFP and Anillin-mCherry were recorded by time lapse microscopy. GFP & mCherry fluorescence were quantified with image J: (A and B) show the telophase / metaphase ratio of Anillin-mCherry (A) or Sqh-GFP (B) fluorescence intensity associated with the cleavage furrow or with endomembranes (2 independent experiments, error bar represents SD).

Movie 1. Tubby-GFP and α -Tubulin-mCherry in Dividing Control S2 Cells Observed by Epifluorescence as Shown in Figure 3A

Tubby-GFP as a PI(4,5)P2 reporter, pseudo-colored in a rainbow heat-map (left panel), Tubby-GFP (green) and α -Tubulin (red) on the merge right panel. Frames were collected every 7 min. Time compression is 1680x.

Movie 2. Tubby-GFP and α -Tubulin-mCherry in Dividing dOCRL-Depleted S2 Cells Observed by Epifluorescence as Shown in Figure 3A

Tubby-GFP as a PI(4,5)P2 reporter, pseudo-colored in a rainbow heat-map (left panel), Tubby-GFP (green) and α -Tubulin (red) on the merge right panel. Frames were collected every 4 min. Time compression is 1680x.

Movie 3. Anillin-mCherry and MRLC^{sqh}-GFP in Dividing Control S2 Cells Observed by Epifluorescence as Shown in Figure 4B

Anillin-mCherry (red) and MRLC^{sqh}-GFP (green). Frames were collected every 6 min. Time compression is 2160 x.

Movie 4. Anillin-mCherry and MRLC^{sqh}-GFP in dOCRL-Depleted S2 Cells Observed by Epifluorescence as Shown in Figure 4B

Anillin-mCherry (red) and MRLC^{sqh}-GFP (green). Frames were collected every 6 min. Time compression is 2160 x.

Supplemental Experimental Procedures

DNA Constructs

The dOCRL (CG3573) cDNA was amplified using Phusion polymerase (Finnzymes) from clone LD39196 (Gold collection; Drosophila Genomics Resource Center) using primers 5'-TATAAAGCTTCCATGGACACGTTGAGCGAGGC-3' (sense) and 5'-TATAGGGCCCCTATGCCTGCAGACCCGCCGGTCCC-3' (antisense) and C-terminally fused with EGFP or mCherry in a pAc5.1 vector (Invitrogen). GFP-Utrophin [1], were sub-cloned in the pAc5.1 vector (Invitrogen). pUAS-GFP-Tubby and pUAS-mCherry-PLC δ were from Amy Kiger and pUAS-GFP-Rab7 was from Marcos Gonzalez-Gaitan.

Cell Culture and dsRNA Treatment

Drosophila S2 cells were grown in FCS supplemented Schneider's medium (Invitrogen). Stable cell lines were generated expressing GFP-dOCRL, mCherry-dOCRL, GFP-dOCRL-PD (phosphatase dead), GFP-Utrophin, Tubulin-GFP or GFP-Tubby using Fugene HD (Roche) as a transfection reagent and Hygromycin B as a selection agent. GFP-Tubby and GFP-Utrophin-CH were sorted using FACSaria (BD) for low level of expression to allow high specificity of the probes. Anillin-mCherry and Sqh-GFP cell line was from Gilles Hickson. For dOCRL extinction, dsRNAs were produced and used as previously described [2] we used at least three non-overlapping regions to rule out off-target effects.

Primer sequences:

dOCRL_dsRNA1 : (Forward, AAGTGCTTTGAGGGCTACACC ; Reverse, ACGTGCAGGATGAGAATATCG).

dOCRL_dsRNA2 (Forward, TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGGACATTGTCAAGGAGCGC ; Reverse, TAATACGACTCACTATAGGGGAGAATCGCGTAGATATCCGGCGGC).

dOCRL_dsRNA 5'UTR (Forward, TAATACGACTCACTATAGGGGATTGCCAATAATTGTCATCGC; Reverse, TAATACGACTCACTATAGGGGATTCTGAG TACTGATAGGG).

For fixed sample microscopy cells were cultured on glass cover slips for 6 days. Cells were treated at day 0 and day 3 with 3 μ g of dsRNA. For time lapse microscopy, cells were cultured in a 96 well glass bottom plate (Greiner) and were treated at day 0 and day 3 with 1 μ g dsRNA.

Screening Procedure

Drosophila S2 cells stably expressing Tubulin-GFP were treated for 6 days with the indicated dsRNA amplified from the Open Biosystems *Drosophila* library. Cells were then imaged using a Leica inverted microscope, under controlled temperature. Images were acquired with a cool snap HQ2 camera every 17 minutes and analyzed using ImageJ and Metamorph softwares (Molecular Devices).

Imaging of Fixed Samples, Time-Lapse Recording, and Measurements

For immuno-fluorescence analysis, at day 6 cells were fixed in 4% Formaldehyde and proceed for immuno-staining [2]. We used: anti α -Tubulin (Sigma) 1:200; anti RhoA [3] 1:25; anti Rab 5 (abcam) 1:250; Alexa-488, Alexa-546 conjugated secondary antibodies (Molecular probes) were used at 1:200. Texas Red-X phalloidin and Alexa fluor 647 phalloidin (Molecular probes) were used at 1:100

for F-actin staining. Fixed cells were mounted in Vectashield mounting medium with Dapi (Vector lab). Images were acquired using a DeltaVision microscope, with voxels collected at 106 nm lateral and 100 nm axial intervals. Deconvolution was carried out using the SoftWoRx software. Video microscopy was performed on cells plated on 96 well glass bottom plates. Cells were incubated in an environmental chamber at 27°C and imaged with a DeltaVision microscope (Applied Precision) equipped with a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics) and with an ×60 planApo objective. All images were prepared for publication using Adobe Photoshop to adjust contrast and levels and Adobe Illustrator to prepare the figures. For quantification, images were analyzed using ImageJ software (NIH): For fluorescence quantification background of each individual cell were measured and subtracted from the final quantification. For each experiment, at least 2 independent experiments and 50 cells were measured from fixed images and at least 15 cells per condition were measured for time lapse microscopy. The quantifications of multinucleated cells were done automatically using ImageJ software (NIH) and confirmed manually, 3 to 6 independent experiments were performed per each condition and at least 500 cells were counted.

Supplemental References

1. Burkel, B.M., von Dassow, G., and Bement, W.M. (2007). Versatile fluorescent probes for actin filaments based on the actin-binding domain of utrophin. *Cell Motil Cytoskeleton* *64*, 822-832.
2. Carreno, S., Kouranti, I., Glusman, E.S., Fuller, M.T., Echard, A., and Payre, F. (2008). Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J Cell Biol* *180*, 739-746.
3. Magie, C.R., Pinto-Santini, D., and Parkhurst, S.M. (2002). Rho1 interacts with p120ctn and alpha-catenin, and regulates cadherin-based adherens junction components in *Drosophila*. *Development* *129*, 3771-3782.

DISCUSSION

La division cellulaire est un processus complexe qui requiert un intense remodelage du cortex, nécessaire à l'orientation du fuseau mitotique et au clivage de la cellule mère en deux cellules filles. Ce cortex, constitué essentiellement de membrane plasmique et du cytosquelette d'Actine sous-jacent, n'est pas figé dans le temps mais au contraire est très dynamique, à l'image de nombreuses protéines et molécules lipidiques qui le composent. Parmi les constituants de la membrane plasmique, le PI(4,5)P2 est connu pour participer à la formation de l'anneau d'Actomyosine en anaphase et à sa contraction, de multiples façons (cf. 53). Bien que la régulation de ce phosphoinositide soit essentielle à l'intégrité de la division, incluant son anisotropie de distribution en anaphase caractérisée par un enrichissement équatorial, les mécanismes régulateurs permettant de contrôler sa localisation, sa synthèse ou encore son hydrolyse spécifiquement en mitose ne sont pas tous caractérisés (cf. 52).

Dans cette étude, nous mettons en évidence que la protéine dOcr1 est nécessaire à l'homéostasie du PI(4,5)P2, c'est-à-dire à son enrichissement à la membrane plasmique au détriment des vésicules intracellulaires. De plus, nos données montrent que l'accumulation ectopique de ce phosphoinositide sur les endomembranes suite à l'inhibition de dOcr1 se traduit non seulement par une dérégulation profonde du trafic vésiculaire et notamment des endosomes, mais également par une délocalisation partielle de la machinerie du sillon de clivage sur ces vésicules intracellulaires ne permettant pas une ingression complète de l'anneau d'Actomyosine. La régression subséquente de l'anneau contractile se traduit par un fort pourcentage de cellules multinucléées.

Suite à l'inhibition de dOcr1, quels sont les mécanismes moléculaires ou voies de signalisation altérés conduisant à l'accumulation de vésicules intracellulaires ? A la régression de l'anneau d'Actomyosine ? Connaissant l'activité 5-phosphatase de dOcr1, son affinité envers le PI(4,5)P2 et sa localisation intracellulaire, ces anomalies sont-elles simplement induites par un excès de PI(4,5)P2 sur les endomembranes, ou sont-elles également induites par la perte d'interaction de dOcr1 avec certains de ses interacteurs impliqués dans le trafic vésiculaire et la mitose tels que Rab35 ? Ou encore l'excès de PI(4,5)P2 résulte-t-il uniquement de la perte d'activité 5-phosphatase de dOcr1 ou est-il également et partiellement une conséquence de la dérégulation du trafic des endosomes ? Malheureusement, en raison d'une vive compétition sur le rôle de dOcr1 dans la division cellulaire, notre étude, descriptive, ne permet pas dans l'état actuel de répondre à ces

questions, ni de discriminer avec précision les causes des conséquences. Ainsi, l'accumulation des endosomes et leur taille démesurée pourraient être une conséquence de leur enrichissement en PI(4,5)P2, qui ne permettrait plus leur fusion avec la membrane plasmique. Inversement, la dérégulation du trafic des endosomes due à un éventuel défaut de formation de complexes protéiques constitués de dOcr1 et de Rab35 pourrait participer à l'enrichissement du PI(4,5)P2 sur ces endomembranes en abolissant leur fusion avec la membrane plasmique. Il serait intéressant d'approfondir certaines de ces questions, afin d'avoir une vision plus intégrative du rôle de dOcr1 et du PI(4,5)P2 dans le processus mitotique. Dans l'état actuel, nous pouvons suggérer différentes hypothèses concernant certaines de ces interrogations.

Par quel(s) mécanisme(s) l'inhibition de dOcr1 altère l'homéostasie du PI(4,5)P2, c'est à dire sa distribution à la membrane plasmique versus sur les endomembranes.

Alors qu'en condition sauvage le PI(4,5)P2 est un phosphoinositide enrichi préférentiellement à la membrane plasmique, l'inhibition de dOcr1 ou de son activité 5-phosphatase conduit à un excès de PI(4,5)P2 endomembranaire. Plusieurs hypothèses non exclusives permettent d'expliquer cette observation. Tout d'abord, de par son activité 5-phosphatase spécifique du PI(4,5)P2 [203] et sa localisation sur les endosomes, dOcr1 pourrait contribuer à l'homéostasie du PI(4,5)P2 en déphosphorylant celui-ci sur les endomembranes, le restreignant ainsi à la membrane plasmique. Cependant la réalité est certainement beaucoup plus complexe. En effet, si l'inhibition de dOcr1 avait pour seule conséquence la déphosphorylation du PI(4,5)P2 des endomembranes, nous nous serions attendus à avoir un excès de PI(4,5)P2 membranaire, toute membrane confondue. Or la distribution excessive de PI(4,5)P2 sur les endomembranes semble se faire au détriment de la membrane plasmique. D'autre part, en anaphase, suite à l'inhibition de dOcr1 le taux de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique n'est pas seulement réduit, mais anormalement distribué comme le montre son faible enrichissement à la membrane plasmique équatoriale versus les membranes plasmiques polaires.

Dans le cadre d'une autre étude, nous avons montré que la production du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique en mitose est essentiellement dépendante de la kinase Skittles et de la phosphatase Pten, et que ces deux enzymes se trouvent enrichies à l'équateur en anaphase et au sillon de clivage en télophase (cf. article 2 page 63). La distribution dynamique de ces deux enzymes au cours de la mitose constitue un mécanisme majeur de régulation de la distribution du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique, incluant son enrichissement à l'équateur en anaphase (cf. article 2 page 63). Cette étude suggère

également que la localisation de Pten à la membrane plasmique est dépendante de sa liaison au PI(4,5)P2. L'inhibition de dOcr1 conduisant à un excès de PI(4,5)P2 endomembranaire, Pten pourrait être recruté sur ces vésicules intracellulaires et participer à l'enrichissement du PI(4,5)P2 en déphosphorylant le PI(3,4,5)P3. Il serait donc intéressant d'observer la localisation de Pten après déplétion de dOcr1, afin d'évaluer sa contribution éventuelle dans la distribution altérée du PI(4,5)P2. Si Pten est effectivement délocalisé sur ces vésicules intracellulaires, et si celles-ci contiennent du PI(3,4,5)P3 dans leur membrane, alors l'inhibition de Pten couplée à celle de dOcr1 devrait théoriquement se traduire par une réduction (modérée) du PI(4,5)P2 endomembranaire associée à un excès de PI(3,4,5)P3 sur ces vésicules.

Par ailleurs, la localisation membranaire de la PI(4)P 5-kinase Skittles ne semble pas être dépendante du PI(4,5)P2 (cf. article 2 page 63), mais plusieurs études suggèrent que la localisation et l'activation des PI(4)P 5-Kinases sont dépendantes des petites GTPases de la famille Rho [178], [179], [180], [181]. L'inhibition de dOcr1 provoquant un enrichissement de Rho1 sur ces vésicules intracellulaires, nous pouvons émettre l'hypothèse que Skittles est également recrutée et activée sur ces vésicules en raison de la localisation ectopique de Rho1 sur ces endosomes. Par ailleurs, un modèle stipule que des PI(4)P 5-kinases (orthologue de Skittles) sont transportées sous forme inactive par des endosomes de recyclage puis délivrées préférentiellement à la membrane plasmique du pont intercellulaire où elles sont activées (cf. 52). Bien que n'ayant jamais observé de localisation endomembranaire de Skittles en condition sauvage (cf. article 2 page 63), nous ne pouvons exclure formellement leur présence sur ces vésicules suite à l'inhibition de dOcr1, où elles pourraient être activées par la GTPase Rho1 et ainsi participer à l'enrichissement du PI(4,5)P2 sur ces endomembranes. De façon similaire à celle de Pten, l'inhibition de Skittles couplée à celle de dOcr1 devrait théoriquement se traduire par une réduction modérée du PI(4,5)P2 endomembranaire.

Si ces suppositions sont confirmées, l'inhibition de dOcr1 provoquerait le recrutement de Skittles et/ou de Pten sur ces vésicules intracellulaires au détriment de la membrane plasmique équatoriale, altérant ainsi l'homéostasie du PI(4,5)P2. En pratique, il est possible que les résultats des expériences effectuées afin d'évaluer la contribution respective de Skittles et de Pten dans l'enrichissement du PI(4,5)P2 endomembranaire ne soient pas conclusifs. En effet, ayant montré dans le cadre d'une autre étude (cf. article 2 page 63) que Skittles et Pten sont les deux enzymes majeurs de la production du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique, nous avons trouvé que l'inhibition simultanée de ces deux protéines ne réduit pas le taux de PI(4,5)P2 en comparaison aux cellules sauvages (résultat non

montré). Ce résultat surprenant peut être dû à la complexité du métabolisme des phosphoinositides et à l'existence potentielle de multiples voies de régulation des phosphoinositides.

Il est également possible que l'excès de PI(4,5)P2 endomembranaire soit favorisé par une fusion défectueuse des endosomes avec la membrane plasmique. En effet, plusieurs études mettent en évidence l'existence d'un trafic vésiculaire constitué d'endosomes, qui en fusionnant avec la membrane plasmique préférentiellement à l'équateur participent à l'apport membranaire (cf. 512). Une de ces études met en évidence que ces fusions d'endosome participent également à l'apport de PI(4,5)P2, même si le pool de PI(4,5)P2 présent sur les membranes des endosomes semble relativement peu important [158]. La composition de ces endosomes étant modifiée suite à l'inhibition de dOcr1, notamment en raison d'une excessive quantité de PI(4,5)P2, il est possible que la fusion des endosomes avec la membrane plasmique soit altérée conduisant à un stockage de membranes riches en PI(4,5)P2 dans le cytoplasme des cellules. Le défaut de fusion des endosomes avec la membrane plasmique pourrait également être induit par une mauvaise activation ou localisation d'interacteurs de dOcr1 impliqués dans le trafic vésiculaire, tel que la GTPase Rab35. En effet, l'équipe d'Arnaud Echard a précédemment mis en évidence l'existence d'une interaction directe entre la protéine Ocr1 humaine et Rab35 [204], et montré que l'inactivation de cette GTPase conduit à l'accumulation intracellulaire d'endosomes, dont le recyclage vers la membrane plasmique est inhibé [146]. Même si Ocr1 est décrit pour être un effecteur et non un régulateur de Rab35, il serait intéressant d'observer la localisation et l'état d'activation de cette GTPase suite à l'inhibition de dOcr1. Cette inhibition totale ou partielle de la fusion des endosomes avec la membrane plasmique pourrait expliquer pourquoi le taux de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique est réduit suite à l'inhibition de dOcr1, qui plus est à l'équateur, et au contraire augmenté sur les endomembranes.

Etant donné la complexité du métabolisme des phosphoinositides et l'existence de multiples voies de signalisation qui régulent leur production et leur dégradation, il est probable que la mauvaise distribution du PI(4,5)P2 induite par l'inhibition de dOcr1 soit le fruit d'une dérégulation de plusieurs mécanismes régulateurs et non le résultat d'une « simple » absence de déphosphorylation par dOcr1. Des expériences complémentaires visant à évaluer la contribution respective de ces différents mécanismes (dont la « séquestration » de Skittles et/ou de Pten sur les vésicules intracellulaires) dans le maintien de l'homéostasie du PI(4,5)P2 seraient intéressantes à réaliser.

Quelles sont les causes possibles de la régression du sillon de clivage.

Comme l'attestent les expériences de microscopie 5D effectuées sur des cellules n'exprimant plus d'Ocrl, notre étude montre que cette protéine participe à l'ingression du sillon de clivage (directement ou indirectement) et à ce titre à l'intégrité de la division cellulaire. En effet, l'inhibition de dOcrl ou de son activité 5-phosphatase n'abolit pas la formation de l'anneau d'actomyosine à l'équateur, mais rend celui-ci inapte au clivage de la cellule mère induisant un fort pourcentage de binucléation. Notre étude ne permet pas dans l'état actuel d'identifier ou de caractériser avec précision quel sont les causes de la régression du sillon de clivage, cependant plusieurs hypothèses peuvent être avancées, mutuellement non exclusives.

Comme nous venons de le voir, notre étude met en évidence que le taux de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique est réduit suite à l'inhibition de dOcrl, ne permettant pas d'enrichir correctement ce phosphoinositide à la membrane plasmique équatoriale. Or l'enrichissement du PI(4,5)P2 à l'équateur est particulièrement important pour réguler la dynamique de l'Actine et la contractilité de l'anneau d'Actomyosine (cf. 53). De façon intéressante, la réduction du PI(4,5)P2 membranaire disponible dans les cellules CHO par l'expression d'un mutant PI(4)P 5-kinase muté pour le domaine kinase ou par la micro-injection d'anticorps spécifiques du PI(4,5)P2 cause une augmentation significative du nombre de cellules multinucléées [160], [159]. La réduction du taux de PI(4,5)P2 disponible à la membrane plasmique de ces cellules ne permettrait pas de recruter ou d'activer correctement différents composants de la machinerie du sillon de clivage. De façon similaire, la réduction du taux de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique équatoriale suite à l'inhibition de dOcrl pourrait en soit être suffisante pour abolir l'ingression complète du sillon de clivage, en raison d'un recrutement insuffisant de certains constituants de la machinerie du sillon de clivage tels que Rho, l'Actine filamenteuse ou encore la chaîne légère de la Myosine. Cette hypothèse est soutenue par nos observations, qui mettent en évidence une délocalisation partielle de l'ensemble de ces protéines sur les vésicules intracellulaires au détriment de la membrane plasmique équatoriale.

En plus d'une insuffisante quantité de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique équatoriale, le défaut d'ingression du sillon de clivage pourrait être induit par une rupture partielle du dialogue entre le fuseau mitotique et le cytosquelette d'Actine. En effet, les microtubules du fuseau central sont particulièrement importants pour localiser et induire la formation du sillon de clivage dans la plupart des cellules de mammifère, en constituant un support physique nécessaire à l'activation locale de la petite GTPase RhoA (cf. 3311). Ainsi,

un bloc physique placé entre le fuseau central et le cortex inhibe l'ingression du sillon de clivage, en abolissant l'activation correcte microtubules-dépendante de Rho au cortex [88]. La signalisation du sillon de clivage par les microtubules est également déterminante dans les cellules de *Drosophile* (cf. 3312). Il ne serait donc pas surprenant, étant donné la quantité de vésicules présentes entre le fuseau mitotique et le cortex suite à l'inhibition de dOcr1, que la diffusion des signaux entre le fuseau mitotique et l'Actine corticale soit rompue ou altérée dans ces conditions, ne permettant pas d'activer convenablement la GTPase Rho à la membrane plasmique équatoriale. Ce mécanisme ne permet pas à priori d'expliquer le recrutement de la GTPase Rho sur les vésicules intracellulaires, mais peut participer au recrutement insuffisant de la GTPase Rho et des différents composants de la machinerie du sillon de clivage à la membrane plasmique équatoriale, et ainsi à l'altération de la composition et/ou de la contractilité de l'anneau d'actomyosine. D'autre part, rappelons que dans les cellules de mammifères la GTPase Rho1 est activée par la Rho-GEF ECT2 qui est recrutée par la centralspindle sur les microtubules du fuseau central, puis Rho-GTP est transloquée à la membrane la plus proche qui se trouve être la membrane plasmique équatoriale (cf. 3311). Chez la *drosophile*, bien que la Rho-GEF Pebble (orthologue d'ECT2) semble être préférentiellement localisée au cortex équatorial, (cf. 3312), nous ne pouvons exclure une présence résiduelle de cette Rho-GEF sur les microtubules du fuseau central. D'autant plus que dans les cellules de *drosophile* dites « asterless » l'activation de RhoA à l'équateur serait dépendante des microtubules du fuseau central (cf. 3312). Si Pebble est effectivement localisée sur les microtubules du fuseau central chez la *drosophile*, même partiellement, RhoA-GTP pourrait alors être transloquée à la membrane la plus proche qui ne serait plus la membrane plasmique équatoriale mais les membranes des vésicules intracellulaires à proximité du fuseau central suite à l'inhibition de dOcr1.

Enfin, ces nombreuses vésicules intracellulaires, de taille relativement importante, pourraient également constituer un bloc physique à l'intérieur même de l'anneau contractile, ne permettant pas sa complète ingression. Cette hypothèse est soutenue par le fait que ces nombreuses vésicules ont tendance à se relocaliser dans la zone équatoriale de la cellule durant toute l'anaphase, sans que l'on en connaisse pour autant les raisons.

Il est probable que les défauts de division observés tels que la régression du sillon de clivage soient une conséquence de plusieurs causes. Il serait intéressant de les identifier et de les caractériser, afin de mieux comprendre par quels mécanismes moléculaires l'inhibition de dOcr1 conduit à la formation de cellules plurinucléées. Ainsi, afin de déterminer si l'enrichissement du PI(4,5)P2 à la membrane des endosomes constitue la cause originelle menant au défaut de clivage de la cellule mère, la déphosphorylation du PI(4,5)P2

spécifiquement à la membrane des endosomes pourrait être tentée pour éventuellement restaurer une contraction complète de l'anneau d'Actomyosine. A cette fin, nous pourrions tirer parti de l'affinité de certaines protéines, Rab notamment, pour les endosomes (précoces, tardifs ou de recyclage), et de la puissance de l'expérience Rapamycine précédemment décrite (cf. article 2 page 63). L'ajout de rapamycine induirait une hétérodimérisation entre le domaine FKBP12 en fusion à un domaine 5-phosphatase (cytoplasmique) et le domaine FRB en fusion à une protéine Rab (ou un domaine de celle-ci connue pour spécifier sa localisation aux endosomes). Bien que d'une efficacité incertaine, cette expérience serait intéressante à réaliser.

Le(s) rôle(s) fonctionnel(s) de dOcr1 dans la mitose sont-il restreints à l'ingression du sillon, ou concernent-ils également le processus d'abscission ?

Alors que notre étude met en évidence l'importance de la protéine dOcr1 pour l'ingression complète du sillon de clivage, une étude publiée simultanément par l'équipe d'A. Echard montre que l'orthologue de dOcr1 chez l'être humain est indispensable non pas à l'ingression du sillon mais au processus d'abscission [204]. En utilisant des cellules HeLa ainsi que des cellules provenant de patients atteints du syndrome de Lowe, cette équipe montre que la GTPase Rab35 liée au GTP interagit directement avec la protéine Ocr1 et la localise à la membrane plasmique du pont intercellulaire en fin de division, pour permettre une déphosphorylation locale du PI(4,5)P2 nécessaire au processus d'abscission [204]. L'inhibition de Rab35 ou d'Ocr1 conduit à un excès de PI(4,5)P2 à la membrane du pont intercellulaire, associé à une densité anormale d'Actine filamenteuse qui serait responsable du défaut d'abscission. Le traitement des cellules avec une faible concentration de Latrunculine, une drogue induisant la dépolymérisation de l'Actine filamenteuse, reverse le phénotype en permettant au processus d'abscission de se produire correctement. Comment expliquer cette divergence de résultats entre nos deux études ?

Tout d'abord, il est important de noter que dans l'étude effectuée par l'équipe d'A. Echard, l'inhibition des deux isoformes d'Ocr1 par le traitement des cellules HeLa avec des ARNs interférents conduit à une réduction certes significative du taux de protéine Ocr1 endogène, qui demeure cependant incomplète (réduction de 85%) [204]. Il est possible que le niveau protéique d'Ocr1 ne soit pas nul en raison de la durée du traitement au siRNA relativement faible (3 jours). Afin d'optimiser la déplétion des cellules S2 en dOcr1, nous avons traité les cellules avec des dsRNA dirigés contre la protéine dOcr1 durant 6 jours consécutifs en raison d'un traitement tous les 3 jours, permettant de réduire le taux protéique de dOcr1 de 95%. Or il a été montré que l'inhibition fonctionnelle de Rab35 (un régulateur

positif d'Ocr1) par l'expression d'un dominant négatif (Rab35^{S22N}) induit des anomalies de division cellulaire relativement « précoces » ou tardives en fonction de son niveau d'expression [146]. De façon surprenante, alors que les cellules avec un faible niveau d'expression de Rab35^{S22N} présentent fréquemment un défaut d'abscission, la surexpression de Rab35^{S22N} conduit à un défaut plus précoce d'ingression du sillon de clivage, associé à une accumulation de vésicules intracellulaires riches en PI(4,5)P2 [146]. Cette similitude des défauts observés suite à l'inhibition de dOcr1 dans notre étude et le fait que la localisation d'Ocr1 dépende de l'état d'activation de Rab35 nous emmène à penser que la divergence des résultats entre nos deux équipes pourrait provenir d'une extinction plus ou moins complète de l'expression du gène Ocr1/ dOcr1. Si cette hypothèse s'avère être juste, un taux réduit de protéines Ocr1 serait suffisant pour permettre une ingression complète du sillon de clivage, mais serait insuffisant à la complétion de l'abscission. Cette contribution différentielle à deux étapes de la mitose pourrait s'expliquer par l'implication modérée de la protéine dOcr1 dans l'enrichissement du PI(4,5)P2 à l'équateur en anaphase, en raison de voies de signalisation parallèles impliquées dans la production locale du PI(4,5)P2 au sillon de clivage via Skittles et Pten (cf. article 2 page 63). Tout en étant nécessaire, un taux réduit de dOcr1 pourrait suffire à un enrichissement du PI(4,5)P2 suffisant pour contrôler la dynamique et la contractilité de l'anneau d'Actomyosine. Au contraire, un niveau d'expression « normal » d'Ocr1 semble être indispensable pour déphosphoryler suffisamment le PI(4,5)P2 à la fin de la cytokinèse, afin de permettre la désorganisation de l'anneau d'Actomyosine nécessaire à l'abscission.

Par ailleurs, il est possible que les rôles fonctionnels de dOcr1 dans le processus mitotique n'aient pas été intégralement conservés au cours de l'évolution, ou au contraire que cette protéine ait acquis une ou des fonction(s) biologique(s) supplémentaire(s). En d'autres termes, il est possible que la protéine dOcr1 ne soit pas nécessaire à l'abscission des cellules S2 de drosophile, tout comme son orthologue humain ne serait pas nécessaire à l'ingression du sillon. D'autre part, en raison des anomalies de division cellulaire relativement « précoces », i.e. la régression du sillon de clivage, il est difficile de mettre en évidence le rôle éventuel de dOcr1 dans les étapes ultérieures de la division cellulaire incluant l'abscission. Cependant, il est intéressant de noter que certaines cellules S2 traitées par un dsRNA contre dOcr1 présentent un pont intercellulaire anormalement long (cf. figure S3D), qui pourrait éventuellement être le fruit d'un processus d'abscission anormal. Il est également important de signaler qu'en raison de duplications géniques au cours de l'évolution, la redondance intergénique est plus fréquente dans le génome humain que dans le génome de drosophile. Ainsi, hormis quelques exceptions, la plupart des cellules d'un organisme humain expriment la phosphatase Inpp5B, qui avec Ocr1 constituent les deux

orthologues de dOcr1. Afin de tester la redondance fonctionnelle de ces deux protéines dans le processus mitotique, il serait intéressant de tester l'inhibition simultanée d'Inpp5B et d'Ocr1 dans des cellules humaines.

Enfin, même si l'ingression du sillon de clivage était complète suite à l'inhibition de dOcr1, il est probable que l'abscission des cellules S2 ne soit pas correcte en raison d'une délocalisation partielle de l'Anilline. Celle-ci, en liant l'Actine, la Myosine, et potentiellement le PI(4,5)P2 de la membrane plasmique par son domaine PH, est essentielle au processus d'abscission dans de nombreux types cellulaires incluant des lignées cellulaires de drosophile [144], [205]. Or suite à l'inhibition de dOcr1 nous montrons que l'Anilline est partiellement délocalisée de la membrane plasmique équatoriale pour être enrichie sur les vésicules intracellulaires tout au long de la division, suggérant que l'abscission ne puisse se faire correctement en raison du rôle critique de cette protéine charnière dans ce processus. Afin d'approfondir le rôle éventuel de dOcr1 dans le mécanisme d'abscission, il pourrait être intéressant d'observer la dynamique de localisation d'autres protéines nécessaires à l'abscission et dont la distribution est PI(4,5)P2 dépendante, telles que la Synthaxine 2 [206].

En conclusion, sans pouvoir affirmer que l'ensemble des anomalies observées suite à l'inhibition de dOcr1 sont directement liées à un excès de PI(4,5)P2 endomembranaire, notre étude suggère qu'en contrôlant l'homéostasie du PI(4,5)P2 dOcr1 favorise la contraction équatoriale et participe ainsi à la morphogénèse cellulaire des cellules mitotiques. En vue d'identifier et de caractériser l'ensemble des mécanismes moléculaires dérégulés suite à l'inhibition de dOcr1, de plus amples expériences seront nécessaires. Celles-ci pourraient également permettre de comprendre les divergences entre nos résultats et ceux de l'équipe d'A.Echard notamment, et d'avoir une vision plus intégrative des rôles fonctionnels de dOcr1 et de son orthologue humain Ocr1 dans le processus mitotique en général et dans les désordres pathologiques associés au syndrome de Lowe.

CONCLUSION

et

DISCUSSION

La morphogénèse tissulaire, essentielle au développement d'un organisme et à son maintien, est permise grâce à l'agencement ordonné des cellules les unes par rapport aux autres. A l'interface entre milieu extracellulaire et cytoplasme, le cortex de la cellule sert de lien pour contrôler l'orientation du fuseau en adéquation avec la configuration de l'environnement extracellulaire. De plus, les modifications successives de la forme cellulaire qui ont lieu ultérieurement lors du processus mitotique sont nécessaires au clivage de la cellule mère en deux cellules filles. Ce remodelage cortical est connu pour être induit par une réorganisation de la membrane plasmique, du cytosquelette d'Actine sous-jacent et / ou de leur association. Comment la cellule coordonne temporellement et spatialement ces modifications architecturales ? Sans pouvoir répondre à cette question, **nos travaux participent à une meilleure compréhension du rôle et de la régulation du PI(4,5)P2, un phosphoinositide cortical, dans la morphogénèse des cellules mitotiques.** Quels sont les voies de signalisation ou mécanismes moléculaires responsables de la distribution du PI(4,5)P2 en division ? En quoi la régulation du PI(4,5)P2, tant qualitative que quantitative, est-elle importante pour l'intégrité du processus mitotique ? Par des approches essentiellement cellulaires, nos études contribuent à répondre à ces questions. Elles permettront peut-être également d'ouvrir des pistes pour mieux comprendre la régulation et les rôles fonctionnels du PI(4,5)P2 et de certaines de ses cibles telles que les protéines ERMs *in vivo*, dont les altérations sont responsables de divers pathologies humaines incluant Syndrome de Lowe et cancers.

I. Dynamique de distribution du PI(4,5)P2 en mitose et mécanismes de régulation.

Malgré l'importance évidente du PI(4,5)P2 dans le processus mitotique et plus particulièrement dans les modifications morphologiques des cellules en division, les mécanismes régulateurs contrôlant son taux ou sa distribution spécifiquement en mitose ne sont toujours pas clairement identifiés. De plus, alors que l'enrichissement de ce phosphoinositide à la membrane équatoriale à la transition métaphase - anaphase est admis et bien caractérisé dans les cellules de mammifères [160], [159], la seule étude effectuée à partir de cellules de drosophile visant à visualiser la localisation du PI(4,5)P2, effectuée par l'équipe de J. Brill, met en évidence une distribution homogène du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique des cellules mitotiques, y compris en ana/télophase [161]. Etant donné le rôle critique de l'enrichissement du PI(4,5)P2 à l'équateur des cellules de mammifère pour l'intégrité de la division cellulaire, cette observation est très surprenante. En se basant sur cette étude, l'équipe de L.C.Cantley émet l'hypothèse qu'au cours de l'évolution les mécanismes régulant la localisation du PI(4,5)P2 ont évolué, permettant au PI(4,5)P2 de

s'enrichir à l'équateur dans les cellules de mammifère, et précise que d'autres études seront nécessaires pour confirmer (ou infirmer) son hypothèse [159].

La dynamique de distribution du PI(4,5)P2 en mitose est-elle évolutivement conservée ?

En désaccord avec les observations effectuées par l'équipe de J. Brill [207], nous trouvons que similairement aux cellules de mammifère le PI(4,5)P2 s'enrichit également à l'équateur dans les cellules somatiques de drosophile S2 à la transition métaphase-anaphase (cf. article 2 page 63). Leur étude étant effectuée sur des spermatocytes, qui sont des cellules non somatiques, il est possible que cette divergence de résultats soit due à une dynamique de localisation du PI(4,5)P2 différente au cours de la méiose et de la mitose. Cette hypothèse est soutenue par le fait que Four wheel drive, une PI-4 kinase probablement impliquée dans la production du PI(4,5)P2 en méiose, est indispensable à la division des spermatocytes [207] mais ne semble pas l'être à la division des cellules somatiques S2. Une autre explication est que leurs expériences en vue de déterminer la localisation du PI(4,5)P2 ont été effectuées *in vivo* dans des conditions expérimentales qui ne sont pas optimales pour l'utilisation de sondes spécifiques des phosphoinositides. A l'exception peut-être des cellules non somatiques, **l'anisotropie de distribution de la sonde Tubby que nous observons à la transition métaphase-anaphase suggère que l'accumulation équatoriale du PI(4,5)P2 est une caractéristique générale de la plupart des cellules animales en division, et que la localisation du PI(4,5)P2 est bel et bien évolutivement conservée de la drosophile à l'homme. A ce titre, les cellules de drosophile peuvent constituer un modèle de choix pour mieux comprendre les mécanismes de régulation du PI(4,5)P2.**

Quelles sont les voies de signalisation ou les mécanismes moléculaires responsables de la régulation du taux de PI(4,5)P2 et de sa distribution dans les cellules mitotiques?

De par la diversité des rôles fonctionnels liés à la distribution dynamique du PI(4,5)P2 dans les cellules mitotiques, il est probable que plusieurs mécanismes non redondants soient impliqués dans la distribution du PI(4,5)P2 ou dans la régulation de sa production. Or s'il est désormais clairement établi tant dans les cellules de drosophile que dans les cellules humaines que la distribution de ce phosphoinositide est isotrope en début de division puis anisotrope en anaphase et télophase, les mécanismes moléculaires ou voies de signalisation qui en sont responsables ne sont que partiellement définis.

Ainsi, bien que les PI(4)P-5 kinases et Pten soient connues pour être enrichies à l'équateur en anaphase, l'importance de leur contribution dans la production du PI(4,5)P2 en division n'a jamais été évaluée. De plus, alors qu'une étude vient tout juste de mettre en évidence l'importance de la protéine Ocrl dans la déphosphorylation du PI(4,5)P2 à la membrane du pont intercellulaire lors de l'abscission [204], nos résultats montrent que l'orthologue dOcrl est également impliqué dans la régulation du PI(4,5)P2 lors des étapes beaucoup plus précoces de la division. Ensemble, nos travaux permettent de mieux comprendre la régulation du PI(4,5)P2 en mitose, qui dépend de plusieurs mécanismes de régulation non redondants. En début de division, la distribution uniforme de la kinase Skittles et de la phosphatase Pten à la membrane plasmique est nécessaire pour produire un taux suffisant de PI(4,5)P2 (figure 36). Celui-ci est restreint à la membrane plasmique grâce à l'activité phosphatase de dOcrl localisé sur les endomembranes. A la transition métaphase – anaphase, la distribution anisotrope du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique est le fruit de plusieurs mécanismes régulateurs qui agissent en parallèle (figure 36) : (1) une production localisée de PI(4,5)P2 via l'enrichissement de Skittles et de Pten à la membrane plasmique équatoriale, et (2) une déphosphorylation du PI(4,5)P2 sur les endomembranes dépendante de la phosphatase dOcrl. Nous ne pouvons cependant exclure l'existence d'autres mécanismes de régulation, tel qu'une éventuelle hydrolyse du PI(4,5)P2 par des phospholipases C préférentiellement aux membranes polaires, ou encore un flux membranaire des pôles vers l'équateur qui pourrait contribuer à l'enrichissement du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique équatoriale. L'injection d'une faible quantité de PI(4,5)P2 marqué en métaphase pourrait peut-être constituer une alternative complémentaire à l'utilisation des sondes pour révéler cet éventuel flux membranaire. **Collectivement, nos travaux montrent qu'à chaque étape de la mitose Skittles, Pten et dOcrl contribuent à réguler le taux et la distribution du PI(4,5)P2 par des voies de signalisation non redondantes.**

Or la dynamique de localisation et le taux PI(4,5)P2 sont des critères essentiels à l'intégrité de la division cellulaire.

II. Mise en évidence de nouveaux rôles du PI(4,5)P2 dans le processus mitotique.

De nombreuses évidences démontrent que le PI(4,5)P2 joue des rôles importants dans le processus mitotique des cellules animales, en permettant notamment l'ancrage de l'anneau d'actomyosine à la membrane plasmique ou en modulant la dynamique et la contractilité de l'anneau d'actomyosine (cf. 53). Hormis son implication dans l'ingression du sillon de clivage et récemment dans le processus d'abscission, quels sont les autres rôles fonctionnels du PI(4,5)P2 pendant la mitose ?

L'anisotropie de distribution du PI(4,5)P2 participe à la création d'un différentiel de plasticité corticale.

La régulation précise des propriétés mécaniques du cortex est essentielle dans les cellules en division pour contrôler les modifications morphologiques complexes qui accompagnent le processus mitotique. Alors que le rôle du PI(4,5)P2 dans la régulation de la contractilité corticale a largement été étudié, via entre autres le recrutement de régulateurs de l'Actine, nos données élargissent le rôle du PI(4,5)P2 aux propriétés mécaniques du cortex aux pôles des cellules mitotiques en anaphase, via la régulation de la dMoésine (cf. article 2 page 63). Plus exactement, en participant à la régulation spatiale de la dMoésine, c'est-à-dire à sa délocalisation des pôles vers l'équateur, la distribution anisotrope du PI(4,5)P2 participe à la création d'un différentiel de plasticité corticale, qui contribue à l'élongation cellulaire caractéristique de l'anaphase B. D'autre part, en plus de cette participation dans la relaxation du cortex polaire via l'appauvrissement de la dMoésine, le PI(4,5)P2 est également indispensable à la stabilité corticale des pôles en permettant un recrutement local et transitoire de la dMoésine au cortex des blebs polaires (cf. article 2 page 63) (figure 36). Ainsi, **si l'accumulation de PI(4,5)P2 à l'équateur contribue à la contractilité du cortex équatorial, nos données mettent en évidence que sa présence résiduelle aux pôles est indispensable pour permettre simultanément la relaxation et la stabilisation du cortex polaire.** Nos données confirment également la capacité du PI(4,5)P2 à localiser et activer (plus ou moins directement) différents constituants de la machinerie du sillon de clivage, puisque sa localisation ectopique sur des endomembranes a pour conséquence une délocalisation partielle des protéines du sillon (cf. article 3 page 82) ne permettant pas une ingression complète de l'anneau d'actomyosine (figure 36). **Ensemble, nos études confirment que la régulation fine du PI(4,5)P2 en mitose est requise au bon déroulement de la division cellulaire, en élargissant les rôles fonctionnels du PI(4,5)P2 aux propriétés mécaniques du cortex polaire. En participant à la création d'un différentiel de plasticité cortical entre les pôles et l'équateur, l'anisotropie de distribution du PI(4,5)P2 participe au clivage de la cellule mère et aux transformations de forme cellulaire que subissent les cellules mitotiques.**

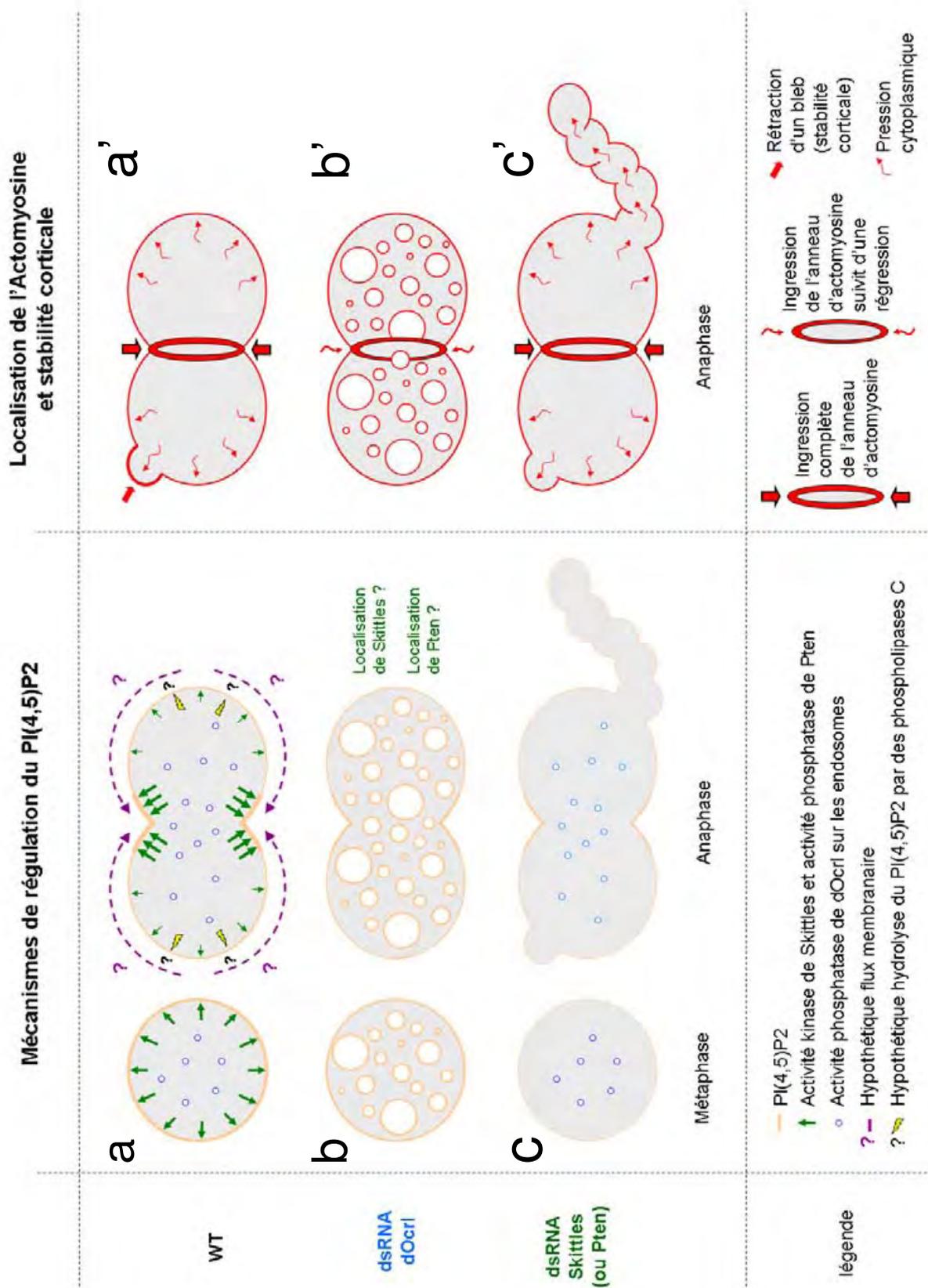


Figure 36 : mécanismes de régulation du PI(4,5)P2 en mitose, et rôles du PI(4,5)P2 sur l'ingression du sillon de clivage et la stabilité corticale.

En comparaison à une cellule sauvage (**a, a'**), l'inhibition de dOcr1 se traduit par un enrichissement du PI(4,5)P2 sur des endomembranes au détriment de la membrane plasmique (**b**), incompatible avec la formation d'un anneau d'actomyosine apte à cliver la cellule mère en deux cellules filles (**b'**). L'inhibition de Skittles ou de Pten conduit à une réduction du taux de PI(4,5)P2 à la membrane plasmique (**c**), drastique au pôles en anaphase à l'origine d'une instabilité corticale caractérisée par la formation de blebs polaires de taille démesurée (**c'**).

Le PI(4,5)P2 contribue-t-il à l'orientation et au centrage du fuseau mitotique ?

Outre sa contribution à la morphogénèse cellulaire en mitose, **nos résultats suggèrent que le PI(4,5)P2 participe également à la stabilisation du fuseau mitotique.** En effet, la réduction du taux de PI(4,5)P2 suite à l'inhibition de Skittles ou de Pten (cf. article 2 page 63), qui sont les deux enzymes qui contribuent de façon significative à la production de ce phosphoinositide durant la division cellulaire, conduit à la formation d'un fuseau mitotique excentré, dont l'axe n'est pas stable mais subit une rotation sur lui-même lors de la métaphase (résultat non montré). La similitude de ces observations avec les cellules déplétées en dMoésine, et le fait que le PI(4,5)P2 constitue un régulateur clef de sa distribution et de sa localisation corticale, nous conduit à émettre l'hypothèse que le PI(4,5)P2 pourrait participer au centrage du fuseau et à la stabilité de son axe via la régulation de la dMoésine. Nous sommes cependant conscients que le PI(4,5)P2 régule, directement ou indirectement, de très nombreuses protéines du cortex, protéines qui pourraient également être impliquées dans ce processus en plus de la dMoésine. Etant donné l'importance de l'orientation du fuseau dans la morphogénèse tissulaire, il serait intéressant d'approfondir les mécanismes par lesquels le PI(4,5)P2 semble participer à la localisation du fuseau mitotique. Par ailleurs, le PI(3,4,5)P3, un autre phosphoinositide de la membrane plasmique, semble impliqué dans l'orientation du fuseau mitotique via la régulation de la Dynéine et de la Dynactine [208], [209]. Nos données suggèrent que le PI(3,4,5)P3 pourrait contrôler l'orientation du fuseau par un mécanisme supplémentaire, en favorisant l'activation de la dMoésine par une production accrue de PI(4,5)P2. En effet, notre étude met en évidence que le PI(3,4,5)P3 est déphosphorylé par Pten en PI(4,5)P2 à chaque phase mitotique, et que ce mécanisme de production de PI(4,5)P2 participe à l'activation de la dMoésine (cf. article 2 page 63). Aussi, plutôt que de se focaliser sur les mécanismes par lesquels le PI(4,5)P2 stabilise et/ou localise le fuseau mitotique, il serait probablement plus judicieux d'adopter une approche plus intégrative et d'élargir l'étude au PI(3,4,5)P3 de la membrane plasmique. Plusieurs études ont examiné la distribution du PI(3,4,5)P3 durant la mitose, et montrent que celui-ci n'est pas détecté à la membrane plasmique des cellules NIH3T3 [159] ou CHO [160] ni dans les spermatozoïdes de drosophile en division [161]. Or notre étude met en évidence que la faible présence du PI(3,4,5)P3 à la membrane plasmique est justement due à sa rapide déphosphorylation en PI(4,5)P2 par Pten, mettant en avant le rôle du PI(3,4,5)P3 dans la production localisée du PI(4,5)P2 pendant la mitose (cf. article 2 page 63).

III. Régulation du PI(4,5)P2 et des protéines ERM dans l'organisme.

La liaison au PI(4,5)P2 et la phosphorylation de la thréonine 559 permettent-elles de moduler différemment l'activité de la dMoésine ?

La cellule est un système complexe, qui au cours de la division cellulaire va subir un intense remodelage cortical associé à une polarisation de nombreux constituants dont le PI(4,5)P2 et la dMoésine (cf. article 2 page 63 et article 3 page 82). Or le remodelage cortical n'est pas propre aux cellules mitotiques, mais se produit également au cours du développement en permettant la morphogénèse tant cellulaire que tissulaire. Ainsi, nos travaux mettent en évidence qu'au cours du développement de la drosophile, l'activation de la dMoésine est nécessaire à la viabilité de l'organisme, en permettant notamment l'intégrité des tissus épithéliaux dont celui de l'aile (cf. article 1 page 59). Cette activation doit cependant être régulée, puisque l'expression d'une forme constitutivement active de la dMoésine n'est pas compatible avec la survie des organismes. Il est possible que des divisions cellulaires anormales contribuent à cette mortalité, puisque nos travaux ont également montré que l'expression d'une forme phosphomimétique par les cellules en culture S2 conduit à près de 50% de cellules binucléées (cf. article 2 page 63).

D'autre part, il est intéressant de noter qu'en fonction du tissu ou de l'organe pris en considération l'activation de la dMoésine n'est pas régulée de façon similaire. Alors que l'enrichissement du PI(4,5)P2 à la surface apicale des cellules épithéliales de l'aile est suffisant pour recruter la dMoésine et permettre une organisation correcte de l'épithélium, l'enrichissement du PI(4,5)P2 aux microvillosités des rhabdomères (au niveau de l'œil) n'est pas suffisant à l'activation de la dMoésine, conduisant à une désorganisation des structures riches en Actine filamenteuse et à une morphogénèse anormale de l'œil. Au sein de cet organe, la dMoésine doit pouvoir être phosphorylée pour assurer correctement ses fonctions. En fait, il est possible que cette régulation différentielle de la dMoésine permette de moduler dans le temps et dans l'espace son activation en adéquation avec son rôle fonctionnel. Le remodelage architectural des photorecepteurs de l'œil en réponse aux signaux lumineux est extrêmement dynamique et dépend de l'état d'activation de la dMoésine. Or le PI(4,5)P2 est enrichi dans les zones où se trouvent les photorecepteurs, ce qui pourrait conduire à une activation « constitutive » de la dMoésine à proximité des photorecepteurs, incompatible avec la physiologie de ces cellules. Tout en permettant au PI(4,5)P2 de réguler spatialement et localement l'activation de la dMoésine au sein des cellules de l'œil, le mécanisme de régulation par phosphorylation / déphosphorylation pourrait être un moyen de la réguler temporellement en modulant très rapidement son

activité. Au contraire, au sein de l'épithélium de l'aile la régulation temporelle de la dMoésine ne semble pas critique, peut-être en raison de la relative stabilité de ce tissu. Il est intéressant de rappeler qu'au cours l'anaphase, alors que l'enrichissement du PI(4,5)P2 à l'équateur est suffisant pour enrichir la dMoésine à la membrane plasmique équatoriale, cette liaison n'est pas suffisante pour recruter la dMoésine au cortex des blebs qui doit pour cela être phosphorylée (cf. article 2 page 63). Or la contractilité du cortex à l'équateur de la cellule est un événement beaucoup plus stable dans le temps que la rétraction du cortex des blebs qui sont eux beaucoup plus transitoires. **L'ensemble de nos travaux suggèrent qu'*in cellulo* autant qu'*in vivo*, l'implication différentielle de la liaison au PI(4,5)P2 et du processus de phosphorylation dans la régulation de la dMoésine peut moduler la temporalité de son activation, conduisant à des réorganisations corticales relativement furtives et transitoires ou au contraire stables dans le temps.** Au vu de l'identification de nouveaux activateurs et inhibiteurs de la dMoésine (cf. article 2 page 63) et du PI(4,5)P2 (cf. article 2 page 63 et article 3 page 82) par des approches cellulaires, il serait intéressant d'approfondir l'étude de ces régulateurs, probablement impliqués dans la morphogénèse tissulaire, au cours du développement *in vivo*. Ces études pourraient contribuer à mieux comprendre certaines pathologies induites par une dérégulation du métabolisme des phosphoinositides, incluant le PI(4,5)P2, et certaines de ses cibles dont les protéines ERMs.

En quoi est-il important de mieux comprendre les mécanismes de régulation et les rôles fonctionnels du PI(4,5)P2 et des protéines ERMs *in vivo* ?

La dérégulation du métabolisme des phosphoinositides est à l'origine de diverses pathologies, dont le syndrome de Lowe autrement appelé syndrome OCRL (Oculo Cerebro Renal Lowe syndrome) qui est induit par une mutation du gène codant Ocr1 [210]. Ce syndrome est caractérisé par différents signes cliniques, incluant des cataractes, des complications rénales ou encore un retard mental [210]. Malgré la gravité de cette pathologie, les mécanismes moléculaires mis en cause ne sont pas parfaitement identifiés. Notre étude sur le rôle de dOcr1 dans le processus mitotique (cf. article 3 page 82) suggère que ce syndrome pourrait partiellement être dû à des défauts de division cellulaire. Cette hypothèse est soutenue par une étude récente effectuée par l'équipe d'A.Echard, qui à partir de cellules rénales de patients atteints du syndrome de Lowe met en évidence un défaut d'abscission en fin de division [204]. Il est cependant intéressant de noter que des travaux effectués par une autre équipe mettent en évidence un défaut de migration dans les cellules provenant de patients atteints de ce syndrome. D'autre part, les protéines ERMs, régulées partiellement par le PI(4,5)P2, participent au bon déroulement de la division cellulaire [63],

[47], mais sont également impliquées dans le processus de migration [133], [134]. Leur surexpression est d'ailleurs souvent corrélée à l'évolution métastatique de certains types de cancers via l'acquisition par les cellules de capacités migratoires et invasives, sans que l'on connaisse précisément les voies de signalisation altérées [211], [212], [213]. La migration et la division cellulaire étant deux processus biologiques présentant de nombreuses similitudes, l'identification de nouveaux régulateurs du PI(4,5)P2 et des ERMs ou une meilleure caractérisation de leurs fonctions dans le cadre de la division pourrait nous permettre de mieux comprendre leur régulation et leurs rôles dans la migration, et à plus long terme nous mener à une meilleure compréhension des pathologies induites par leur dérégulation.

IV. Critiques de mon projet de recherche.

De part les remarques constructives et pertinentes des rapporteurs, examinateur et présidents du jury, la discussion qui a suivi la présentation de mon projet de thèse lors de la soutenance a permis de révéler certains points qu'il aurait été judicieux d'approfondir dans le cadre de cette étude.

Mieux caractériser les contributions respectives de la kinase Slik et du PI(4,5)P2 dans la localisation corticale de la dMoésine.

Le recrutement de la dMoésine au cortex à l'entrée en division nécessite d'une part sa phosphorylation par la kinase Slik, et d'autre part sa liaison au PI(4,5)P2. En effet, l'inhibition de la kinase Slik se traduit par une localisation cytoplasmique de la dMoésine-GFP en prophase, similaire à la localisation de la forme non phosphorylable de la dMoésine (dMoésine-TA-GFP). La phosphorylation de la dMoésine par la kinase Slik à l'entrée en mitose est donc nécessaire à sa localisation corticale. De même, la réduction du taux de PI(4,5)P2 par l'inhibition de Skittles ou par le recrutement Rapamycine-dépendant d'un domaine 5-phosphatase à la membrane conduit à une relocalisation cytoplasmique de la dMoésine en mitose. La liaison de la dMoésine au PI(4,5)P2 est donc elle aussi nécessaire à sa localisation corticale.

Bien que j'ai interprété la relocalisation cytoplasmique de la dMoésine suite à une réduction du PI(4,5)P2 membranaire comme une conséquence directe du PI(4,5)P2 sur la dMoésine, nous ne pouvons exclure que le PI(4,5)P2 contrôle en partie la dMoésine via l'activation ou le recrutement de la kinase Slik à la membrane plasmique. En effet, la localisation corticale de la kinase Slik est régie par des mécanismes présentement inconnus.

Si celle-ci est dépendante d'une liaison au PI(4,5)P₂, alors la réduction de ce phosphoinositide pourrait avoir comme conséquence une relocalisation (totale ou partielle) de Slik dans le cytoplasme, qui ne serait alors plus apte à phosphoryler et stabiliser la dMoésine au cortex.

Dans le but de déterminer si la localisation de la kinase Slik au cortex est dépendante du PI(4,5)P₂, j'ai effectué des expériences qui ne m'ont cependant pas permis de conclure, en raison de difficultés techniques ou d'observations non reproductibles.

Une première expérience consistait à mesurer la distribution cortex/cytoplasme de Slik-GFP en condition sauvage et après réduction du taux de PI(4,5)P₂ par l'utilisation de dsRNA dirigés contre Skittles ou Pten. Malgré de multiples tentatives, je n'ai jamais réussi à obtenir une lignée stable viable exprimant un niveau suffisant de Slik-GFP (quelque soit le promoteur utilisé pour l'expression de Slik-GFP). Les cellules transfectées présentaient une taille excessive et croissante de jour en jour puis éclataient, conduisant à la mort de la lignée. L'expérience a donc été effectuée sur des cellules S2 traitées pendant 6 jours par les dsRNA puis transfectées de façon transitoire par Slik-GFP au 4^{ème} jour. Les différences observées entre les différentes conditions, relatives à la distribution de Slik, étaient subtiles et ne m'ont pas permis de conclure. Il est possible que la très légère redistribution cytoplasmique de Slik-GFP dans les cellules traitées par un dsRNA spécifique de Skittles ou de Pten ne soit pas induite par une diminution du taux de PI(4,5)P₂, mais soit due à une efficacité légèrement atténuée de la transfection. En effet, en fonction de son niveau d'expression, la distribution de Slik-GFP au cortex (versus dans le cytoplasme) varie légèrement. Or l'efficacité des transfections est dépendante de l'état « physiologique » des cellules, qui est probablement altéré suite à l'inhibition de Skittles ou de Pten connue par ailleurs pour intervenir dans de nombreuses voies de signalisation promouvant entre autres la survie cellulaire.

Afin de pallier aux difficultés d'interprétation inhérentes à un niveau d'expression de Slik-GFP plus ou moins hétérogène en fonction des conditions (sauvage versus dsRNA), ainsi qu'à un éventuel problème de surexpression de Slik-GFP qui pourrait modifier sa localisation, j'ai souhaité observer la localisation de la protéine Slik endogène. Malheureusement, l'utilisation d'un anticorps spécifique de Slik pour visualiser la localisation de cette protéine en condition sauvage ou en présence de dsRNA ne nous a pas permis de conclure, de par la mauvaise qualité du marquage obtenu.

Enfin, une dernière tentative a consisté à transfecter des cellules sauvages par Slik-GFP et Tubuline-mCherry, ainsi que par les domaines FRB-mRFP et FKBP12-5 phosphatase-mRFP. L'ajout de rapamycine induit une rapide hétérodimerisation des domaines FRB et FKBP12, conduisant à un recrutement du domaine 5 phosphatase à la membrane plasmique et donc à une rapide déphosphorylation du PI(4,5)P2 en PI(4)P. Outre la difficulté de différencier les cellules interphasiques des cellules mitotiques, le signal mCherry correspondant à la Tubuline étant masqué par le signal mRFP des deux constructions « Rapamycine », l'ajout de rapamycine a conduit à une complète délocalisation de Slik-GFP du cortex vers le cytoplasme dans une seule cellule seulement, que je n'ai jamais réussie à reproduire malgré de nombreuses tentatives. Je ne peux cependant pas être certaine que les cellules présentant un fort signal mRFP expriment bien les deux constructions Rapamycine-mRFP, ce qui ne me permet pas d'affirmer que le taux de PI(4,5)P2 a effectivement été réduit dans les cellules ne présentant pas une relocalisation de Slik-GFP.

Afin de savoir si la localisation corticale de Slik dépend du PI(4,5)P2, il pourrait être judicieux de refaire l'expérience Rapamycine en ajoutant un contrôle permettant de savoir si le PI(4,5)P2 est effectivement déphosphorylé en PI(4)P dans les cellules observées. Dans l'idéal, l'expérience consisterait à transfecter les cellules par Slik-GFP, les deux constructions Rapamycine-mRFP et également par la sonde du PI(4,5)P2 : Tubby-HC Red (qui fluoresce dans le rouge lointain). Afin de discriminer les cellules interphasiques des cellules mitotiques, Slik étant au cortex durant tout le cycle cellulaire, il faudrait également visualiser le fuseau mitotique en transfectant les cellules par la Tubuline-CFP ou par un marqueur de l'ADN permettant de visualiser la plaque métaphasique. Bien que théoriquement possible, la réalisation de cette expérience nécessitait plusieurs clonages et est en pratique difficilement réalisable en raison du nombre de constructions transfectées. De plus, le niveau d'expression des constructions Rapamycine doit être suffisant sans pour autant dépasser un certain seuil, sans quoi le PI(4,5)P2 est déphosphorylé en PI(4)P par le domaine 5-phosphatase avant même d'ajouter la rapamycine. La fenêtre relative au niveau d'expression des constructions Rapamycine est relativement étroite pour la faisabilité de l'expérience, ce qui ajoute une difficulté supplémentaire. Bien que la question de la localisation de Slik dépendante ou non du PI(4,5)P2 soit intéressante, voir cruciale pour l'interprétation de mes données, je n'ai pas fait cette expérience qui demandait beaucoup de mise au point et dont la faisabilité était incertaine, n'ayant plus beaucoup de temps disponible pour finaliser mon travail de doctorat. Il aurait également été intéressant d'effectuer des expériences *in vitro* consistant à évaluer la capacité de Slik à lier des liposomes enrichis en PI(4,5)P2.

Toutefois, même si nous ne pouvons exclure une régulation indirecte du PI(4,5)P2 sur la dMoésine, médiée par le maintien de la kinase Slik au cortex, nos données suggèrent que le PI(4,5)P2 régule la dMoésine au moins en partie indépendamment de la kinase Slik. En effet, une forme pleine taille de la dMoésine, sensible à l'activité kinase de Slik mais incapable de lier le PI(4,5)P2 par mutations du domaine Ferm (mutations FermKN), n'est plus apte à se localiser au cortex à l'entrée en division même en présence de la kinase Slik. Cette expérience suggère mais ne prouve pas formellement le rôle Slik-indépendant du PI(4,5)P2 sur la localisation de la dMoésine, dans la mesure où les mutations ponctuelles du domaine Ferm pourraient altérer la conformation de la dMoésine ne lui permettant plus de se lier à la kinase Slik. Or, en dehors de son activité kinase, Slik pourrait participer à la localisation corticale de la dMoésine en la recrutant au cortex, Slik étant elle-même localisée à la membrane plasmique. Il serait donc souhaitable de vérifier que cette forme mutante de la dMoésine est toujours capable de lier Slik. Il est cependant difficile de mettre en évidence une telle interaction par des expériences de pull-down, dans la mesure où *in vitro* la dMoésine pleine taille adopte préférentiellement une conformation fermée, qui n'est pas représentative de ses modifications conformationnelles rapides et cycliques *in cellulo*.

En conclusion, l'interprétation de mes observations relatives au(x) rôle(s) du PI(4,5)P2 sur la localisation corticale de la dMoésine devrait probablement être plus modérée, ne sachant pas si la localisation (ou l'activité) de Slik au cortex dépend du PI(4,5)P2.

Ajouter une dimension quantitative à notre modèle, présentement qualitatif, aurait probablement augmenté l'impact de nos découvertes relatives à la formation de gradients protéiques et lipidiques.

Il est regrettable que l'ensemble des expériences menées aient conduit à l'élaboration d'un modèle essentiellement qualitatif, au détriment de l'aspect quantitatif. En effet, l'enrichissement de la dMoésine (et de ses principaux régulateurs : PI(4,5)P2, Skittles, Pten, Slik) lors de l'élongation cellulaire ou encore le recrutement de la dMoésine ou de Slik au cortex des blebs sont des processus extrêmement dynamiques, qui auraient gagné à être quantifiés. Cet aspect quantitatif était d'autant plus adapté à ce projet de recherche, qu'une caractéristique des protéines de la famille ERM est peut-être justement leur capacité à cycliser rapidement entre plusieurs formes plus ou moins actives et plus ou moins stables. L'aspect dynamique est donc probablement critique à la fonctionnalité de ces protéines. Par ailleurs, notre étude met en évidence un rôle important du PI(4,5)P2 dans la régulation de la

dMoésine, que cette régulation soit directe ou indirecte, or les phosphoinositides sont des régulateurs majeurs de la dynamique membranaire.

Concrètement, le temps de demi-vie d'une molécule de PI(4,5)P2 étant extrêmement court, et le métabolisme des phosphoinositides étant connu pour utiliser jusqu'à 10% de l'ATP cellulaire en condition de repos, il aurait été intéressant d'approfondir plus en détails le rôle du gradient en Pten ou en Skittles en anaphase dans le turnover du PI(4,5)P2 et dans son anisotropie de distribution à la transition métaphase - anaphase. En effet, il est probable que les molécules de PI(4,5)P2 nouvellement produites puissent diffuser rapidement sur l'ensemble de la membrane plasmique. L'activité localisée de Skittles et/ou de Pten, par l'établissement de gradients de distribution, pourrait participer à maintenir la distribution anisotropique du PI(4,5)P2 telle qu'observée en anaphase entre les pôles et l'équateur. Il est intéressant de noter par exemple que le recrutement à la membrane plasmique d'une sonde spécifique du PI(3,4,5)P3 augmente à l'entrée en division, tout en restant faible. Suite à l'inhibition de Pten, dont l'activité est prédite pour déphosphoryler le PI(3,4,5)P3 en PI(4,5)P2, le recrutement de la sonde du PI(3,4,5)P3 à la membrane plasmique en début de division est très significatif de même que son enrichissement à l'équateur en anaphase. Même si une critique majeure qui peut être faite à l'utilisation de ces sondes est l'impossibilité de quantifier le taux du Phosphoinositide ciblé, elles permettent néanmoins d'avoir une bonne idée de leur turnover. Ainsi, alors que par dosage métabolique au P^{32} Pten ne semble pas contribuer de façon significative à la production globale du PI(4,5)P2 (cf. article 2 page 63), l'utilisation des sondes spécifiques du PI(3,4,5)P3 et du PI(4,5)P2 met en évidence que Pten contribue localement à la production du PI(4,5)P2, en permettant notamment une quantité suffisante de PI(4,5)P2 aux régions polaires des cellules anaphasiques, indispensable au recrutement de la dMoésine au cortex des blebs et donc à la stabilité corticale (cf. article 2 page 63). Ainsi, bien que d'une contribution modérée dans la production globale du PI(4,5)P2, la fonctionnalité de Pten dans la rétraction des blebs PI(4,5)P2-dépendante est essentielle. Il est regrettable que le gradient de distribution de Pten, de Skittles, du PI(4,5)P2 et du PI(3,4,5)P3 entre l'équateur et les pôles (incluant les blebs) n'ait pas été analysé plus en profondeur. Idem pour la localisation très dynamique de la phosphatase Pp1-87B à chacune des phases de la mitose.

De façon similaire, l'étude aurait gagné à être complétée par des données quantitatives relatives à la stabilité de l'association dMoésine - membrane plasmique. Concrètement, des expériences de FRAP sur des cellules exprimant des formes sauvages ou mutantes de la dMoésine (phosphomimétique : dMoésine-TD par exemple) auraient permis d'évaluer de façon plus précise le rôle de la phosphorylation de la thréonine 559

dans la stabilisation de la dMoésine au cortex. Par ailleurs, des expériences de FRAP effectuées sur notre lignée stable exprimant le domaine CH de l'Utrophine (qui permet de visualiser l'actine) et transfectée par une forme WT ou TD de la dMoésine auraient peut-être permis de mettre en évidence une différence de dynamique du cytosquelette d'actine selon le degré d'activation de la dMoésine. Ces données quantitatives nous auraient probablement aidés à mieux comprendre si l'excès d'actine aux pôles des cellules anaphasiques exprimant la forme TD de la dMoésine, que nous avons détecté par un marquage à la phalloïdine, peut être le résultat d'une stabilisation excessive du cytosquelette d'actine à la membrane ou d'une modification de ses propriétés dynamiques.

Pour l'avoir testé, il n'est cependant pas aisé de réaliser ces expériences de FRAP à la transition métaphase-anaphase, lorsque les gradients en dMoésine, Skittles, Pten, PI(4,5)P2, PI(3,4,5)P3 ou Slik se forment, de part la rapidité de cette transition.

De même, la formation et la rétraction des blebs en conditions naturelles sont des processus extrêmement transitoires et furtifs, et l'obtention de films exploitables en vue de quantifier la dynamique de recrutement de la dMoésine ou de Slik au cortex des blebs nécessite de nombreux critères difficilement appréciables. Ainsi, les cellules sélectionnées doivent se trouver en fin de métaphase, sans quoi la photo-toxicité induite par les acquisitions successives ne permet pas aux cellules de passer la transition métaphase-anaphase. La métaphase étant d'une durée approximative de 30 minutes pour les cellules S2, il est difficile de déterminer à un instant « t » si une cellule est en début ou fin de métaphase. Par ailleurs, afin de réduire la photo-toxicité d'une part, et de pouvoir suivre l'évolution des blebs et la localisation de la dMoésine ou de Slik (ou de l'actine) au cortex des blebs toutes les 5 ou 6 secondes, le nombre de plans doit être réduit ne permettant pas d'imager l'ensemble de la cellule. Les blebs se forment le plus souvent en position basale, je choisis généralement de paramétrer les acquisitions en position basale et médiane. Cependant, il arrive que les blebs se forment en position apicale... Enfin, certaines cellules ne présentent pas de bleb lors de leur division, et il n'est pas rare de perdre le focus. Pour toutes ces raisons, il est nécessaire d'effectuer un grand nombre d'acquisitions pour avoir un nombre très limité de films exploitables.

Afin d'obtenir des données quantitatives sur la dynamique de formation et de rétraction des blebs, ainsi que sur la dynamique de recrutement de la dMoésine ou de Slik par exemple au cortex des blebs, nous avons établi une collaboration avec l'équipe du Dr. Ewa Paluch qui a accepté de m'accueillir pendant un mois dans son laboratoire à l'Institut Max Planck à Dresde. Afin de pallier à certaines difficultés présentées précédemment, nous

pensions créer de façon artificielle des blebs en un endroit bien précis du cortex, sur des cellules S2 en métaphase, et ce par l'utilisation d'un microscope confocal équipé d'un laser pulsé adéquat. Toutefois, la pression intracellulaire des cellules mitotiques S2 ne semble pas suffisante pour permettre la formation de blebs aux zones corticales altérées par le laser, à l'inverse des cellules de mammifères. Il serait intéressant de réitérer ces expériences de blebs induits au laser en changeant de modèle cellulaire, ou en incubant les cellules S2 dans un milieu hypotonique de façon à accroître de façon artificielle la pression osmotique.

En conclusion, développer l'aspect quantitatif de cette étude aurait contribué à mettre plus en avant l'aspect dynamique de mon projet de recherche, apportant une dimension supplémentaire à nos découvertes tant sur les mécanismes à l'origine des modifications de forme cellulaire (élongation cellulaire et formation/rétraction des blebs, association actine - membrane) que sur les mécanismes de régulation de la dMoésine (gradient de Pten, de Skittles ou du PI(4,5)P2 entre autres).

V. Perspectives.

Par quel(s) mécanisme(s) les protéines ERM participent-elles à l'orientation du fuseau mitotique, à sa stabilisation et à son positionnement au centre de la cellule ?

Tout d'abord, la poursuite de mon projet de thèse pourrait consister à mieux comprendre par quel(s) mécanisme(s) les protéines de la famille ERM participent à l'orientation du fuseau mitotique, à sa stabilisation, et à son positionnement au centre de la cellule. Plusieurs hypothèses, précédemment développées dans la discussion des Résultats (cf. « L'activation de la dMoésine participe à l'orientation du fuseau mitotique. » p.75) peuvent être testées. Ces hypothèses ne sont bien entendu pas exclusives, et il est probable que plusieurs mécanismes ERM-dépendants agissent en synergie pour contrôler l'orientation du fuseau. Ce champ d'étude me semble intéressant à explorer, particulièrement *in vivo*. En effet, une mauvaise orientation du fuseau mitotique pourrait expliquer (au moins partiellement) les anomalies d'architecture tissulaire observées notamment chez *C-elegans* au cours du développement suite à l'extinction de l'unique gène ERM.

Identification et caractérisation de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la formation et/ou la rétraction des blebs mitotiques.

Un autre aspect que je trouverais extrêmement intéressant à explorer concerne l'identification et la caractérisation de nouveaux acteurs moléculaires impliqués dans la formation et/ou la rétraction des blebs. Une très belle étude publiée récemment dans Nature par l'équipe d'Ewa Paluch met en évidence que plusieurs types de cellules en culture d'origine humaine présentent des blebs aux régions polaires lors de leur élongation en anaphase, suggérant l'universalité de ce mécanisme [183]. D'autre part, cette étude prouve de façon extrêmement intéressante que ces blebs sont fonctionnellement importants pour le processus de division cellulaire, en permettant de dissiper l'augmentation de pression intracellulaire induite par la contraction de l'anneau d'actomyosine [183]. Alors que l'absence de bleb aux régions polaires des cellules anaphasiques conduit fréquemment à la formation de cellules binucléées, la rétraction de blebs de taille excessive conduit à une oscillation du sillon de clivage associée à de l'aneuploïdie [107], [183]. Tout en étant essentielles au processus mitotique, la formation des blebs, leur croissance et leur rétraction doivent donc être régulées.

Notre étude met en évidence plusieurs acteurs moléculaires nécessaires à la rétraction des blebs, incluant la dMoésine et au moins quatre de ses régulateurs, le PI(4,5)P2, Skittles, Pten et Slik. Il est intéressant d'observer qu'en anaphase, aux régions polaires, la kinase Slik est exclusivement localisée au cortex des blebs (cf. article 2 page 63). Par quel(s) mécanisme(s) Slik est recrutée spécifiquement à la membrane des blebs reste cependant à découvrir. En quoi la membrane des blebs est-elle différente de la membrane située de part et d'autre de ces blebs ? Nos expériences de vidéo-microscopie sur la lignée exprimant une sonde de l'Actine (domaine CH de l'Utrophine) montrent clairement que lors de la formation et la croissance des blebs, la membrane est dépourvue d'Actine (cf. article 2 page 63). Il est possible que la dissociation de la membrane plasmique avec l'Actine filamenteuse rende disponible des sites de liaison, indisponibles ou inaccessibles lorsque le cytosquelette d'actine sous jacent est intact. Ainsi, aux régions polaires, ce mécanisme pourrait permettre de recruter exclusivement à la membrane des blebs des molécules telles que Slik ou d'autres protéines restant à caractériser. Mes résultats suggèrent d'ailleurs que d'autres protéines sont impliquées dans la régulation des blebs, dont certaines sont connues pour avoir une localisation corticale.

En effet, lors de mon année de recherche en Master 2, j'ai effectué un crible sur 132 interacteurs connus ou putatifs de la dMoésine afin d'identifier parmi ces candidats lesquels sont impliqués dans la division. Après avoir établi la liste des candidats à partir de recherches bibliographiques et de bases de données obtenues par criblage double hybride, j'ai produit des dsRNA pour chacun des 132 interacteurs. Après de nombreuses mises au point concernant les étapes de fixation, lavages et marquage en plaque 96 puits, de façon à ne pas perdre les cellules S2 qui ont la particularité de ne pas être adhérentes, j'ai traité ces cellules par chacun des 132 dsRNA en raison de deux traitements à trois jours d'intervalle. Les cellules ont ensuite été fixées et marquées pour l'Actine filamenteuse, l' α -Tubuline et l'ADN. Pour chacune de ces conditions, l'analyse de nombreux critères mitotiques incluant le pourcentage de binucléation, des défauts de contraction de l'anneau d'actomyosine, la morphologie et la taille cellulaire, des anomalies du fuseau, des lagging chromosomes ou encore la présence de blebs mitotiques, m'a permise de dresser une liste de candidats au phénotype sauvage, subtil (peu pénétrant) ou flagrant (pénétrant) (*Figure 37 page 110*).

Parmi l'ensemble des candidats testés, plusieurs d'entre eux incluant Expanded, Fat et Hippo conduisent à un intense blebbing membranaire en mitose suite à leur inhibition (*Figure 38A*). Afin de confirmer ces observations faites sur cellules fixées, des analyses sur cellules vivantes exprimant l' α -Tubuline-GFP ont été menées. Ces expériences de Time-Lapse mettent en évidence que l'inhibition d'Expanded, de Fat ou d'Hippo par l'utilisation de dsRNA conduit à un phénotype similaire à l'inhibition de la dMoésine, caractérisé par la présence de blebs en mitose dont la taille est souvent démesurée (*Figure 38B*).

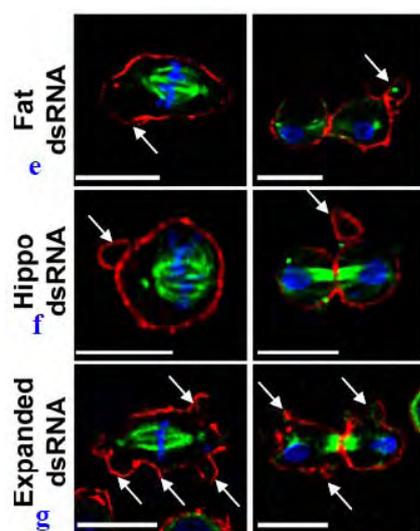


Figure 38A : L'inhibition de Fat, Hippo ou Expanded se traduit par la formation anormale de blebs. Cellules S2 traitées par dsRNA, fixées et marquées pour l'Actine-F (rouge), l' α -Tubuline (vert) et l'ADN (bleu). Les flèches pointent les blebs.

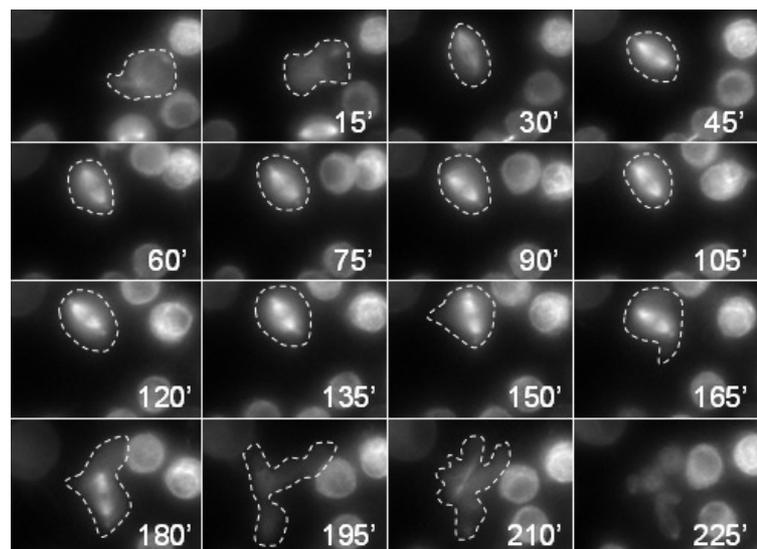


Figure 38B : L'inhibition d'Hippo n'est pas compatible avec la rétraction des blebs. Time-Lapse sur cellules exprimant l' α -Tubuline-GFP et traitées par un dsRNA spécifique d'Hippo.

	Fonction						
	actine	microtubules	phospholipides	signalisation	facteur de transcription	autre	inconnue
Phénotype sauvage	Sema-1a			x			
	Dishevelled			x			
	CG3973						x
	CG12238				x		
	Nidogen					x	
	CG5991		x				
	CG10419						x
	CG7431			x			
	CG31666				x		
	CG14935					x	
	phospholipase D		x				
	PI3K21B		x				
	CG14074						x
	CG3902						x
	CG8145				x		
	Syndecan	x	x	x			
	βspectrin	x	x				
Phénotype "subtil"	α actinin	x					
	Fat	x		x			
	Patched			x			
	Wing blister	x					
	East					x	
	Insulin-like R			x			
	CG7927				x		
	Caf1-180				x		
	CG8939					x	
	CG9576						x
	CG30440	x					
	Vvwox					x	
	CG14218					x	
	Tsc1			x			
	RhoGDI	x					
	PIP5K59B		x				
	CG6040						x
	CG17109					x	
	CG13624				x		
	CG30339						x
	CG32512						x
	CG6686				x		
	Ced-12						x
CG16812						x	
CG6860			x				
CG12325						x	
Phénotype "flagrant"	CG15099						x
	CG14967						x
	CG5645						x
	CG2519						x
	CG2926						x
	Hrs			x			
	Ovarian tumor						x
	Expanded			x			
	Zfh1				x		
	Zipper	x					
	Cpb	x					
	Rho1	x					
	Rho-kinase	x					
	Scrambled	x	x				
	CG1344			x			
	Hippo			x			
	Frazzled			x			
	genghis khan			x			
	Rac1	x					
	Rac2	x					
	Crk						x
	Slik			x			
	Aurora			x			
	RhoGAPp190	x					
	RhoGAP54D	x					
	Skittles		x				
	CG6355		x				
sine oculis				x			
Armadillo	x						
CG14322						x	
CENP-E		x					
CG31619						x	
CG32654						x	
CG10418						x	
CG11322						x	
CG16798						x	
CG4294						x	
CG7177			x				
Contactin						x	
Pten		x					
Fak56D			x				
Mbs	x						
Hillarlin						x	

Figure 37 : Classement de 86 des 132 interacteurs connus ou putatifs de la dMoésine, en fonction du phénotype associé à leur inhibition (sauvage, subtil ou flagrant) et de leur rôle fonctionnel majeur. Liste établie suite à l'observation de cellules S2 inhibées pour chacun de ces gènes, puis fixées et marquées pour l'Actine-F, l'α-Tubuline et l'ADN. 10 de ces gènes ont déjà été identifiés dans des cribles pan-génomiques comme induisant des défauts de division, au phénotype subtil (surlignés en orange) ou flagrant (surlignés en rose).

Il est intéressant de noter que ces trois candidats, Expanded, Fat et Hippo, sont connus pour être impliqués dans une même voie de signalisation, « l'Hippo pathway » (Figure 39). Chez *Drosophila melanogaster*, la cadhérine Fat contrôlerait la localisation et l'activation d'Expanded (figure 39). Bien que les mécanismes à l'origine de l'activation d'Hippo ne soient pas totalement compris, il semblerait que celle-ci soit induite par Expanded et Merlin (figure 39). Après activation, Hippo phosphoryle les protéines Salvador et Mats ainsi que la sérine/thréonine kinase Warts qui inactive ensuite par phosphorylation Yorkie, un co-activateur transcriptionnel capable d'induire l'expression de plusieurs gènes tels que la cycline E et DIAP1 (figure 39).

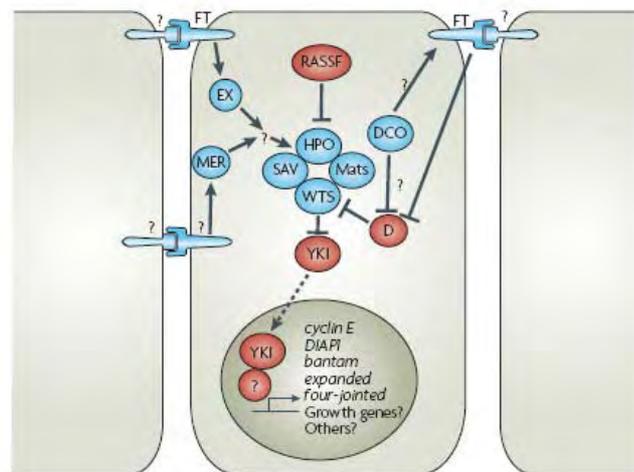


Figure 39 : Hippo Pathway chez la Drosophile.

Fat (FT) active Expanded (Ex) qui participe avec Merlin (MER) à l'activation d'Hippo (HPO). L'activation d'Hippo conduit à la phosphorylation de Salvador (SAV), Mats et Warts (WTS) qui inhibe Yorkie (YKI) un co-activateur capable d'induire l'expression de la cycline E et de DIAP1 entre autres.
D'après Harvey & al, 2007

J'ai donc par la suite testé les conséquences de l'inhibition d'autres composants de cette voie de signalisation, dont l'interaction avec la dMoésine n'a jusqu'alors jamais été montrée. La quantification du pourcentage de cellules mitotiques présentant des blebs de taille excessive en mitose révèle qu'au moins deux autres protéines de l'Hippo pathway sont impliquées (directement ou indirectement) dans la formation ou la rétraction des blebs. Il s'agit de Salvador et de Merlin (figure 40). Il serait intéressant de tester l'inhibition des autres composants de l'Hippo pathway, pour déterminer si l'intégralité de cette voie est impliquée dans la régulation de la stabilité corticale en mitose.

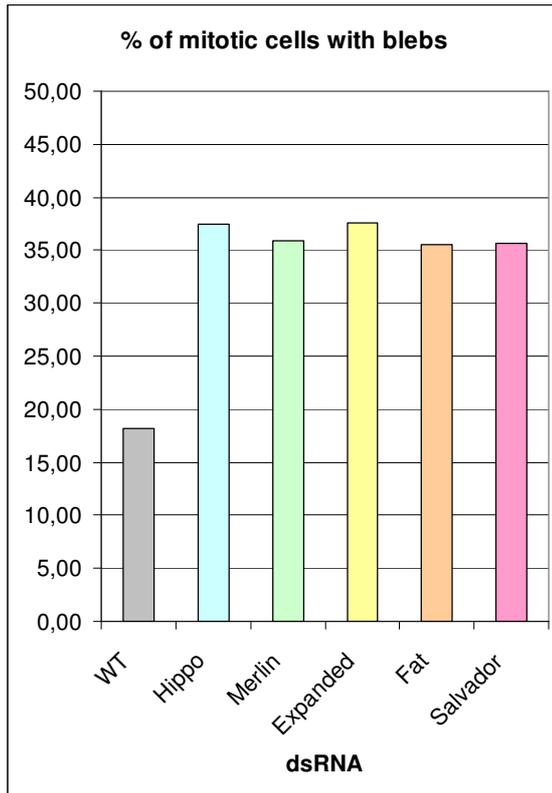


Figure 40 : au moins cinq constituants de l'Hippo Pathway régulent la formation et/ou la rétraction des blebs mitotiques.

Alors qu'en condition sauvage le pourcentage de cellules mitotiques avec blebs est de l'ordre de 18%, celui-ci est supérieur à 35% après inhibition d'Hippo, Merlin, Expanded, Fat ou Salvador par l'utilisation de dsRNA. Les pourcentages de cellules mitotiques avec blebs sont obtenus suite à des expériences de Time-Lapse effectuées sur la lignée exprimant de façon stable l' α -Tubuline-GFP.

La voie Hippo étant connue pour son rôle majeur dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, il serait intéressant d'approfondir son implication dans le remodelage cortical en mitose et plus particulièrement dans le contrôle des blebs. Ainsi, une première expérience simple à réaliser pourrait consister à tester si la localisation ou l'activation de la dMoésine est altérée suite à l'inhibition des constituants de l'Hippo pathway tels qu'Expanded, Fat, Hippo, Merlin, ou Salvador pour n'en citer que quelques-uns. Cette étude pourrait également mettre en évidence un lien direct entre division cellulaire et apoptose, dont l'existence est jusqu'alors toujours débattue.

REFERENCES

1. Conde, C. and A. Caceres, *Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(5): p. 319-32.
2. Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon, *ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 586-99.
3. Roch, F., et al., *Differential roles of PtdIns(4,5)P2 and phosphorylation in moesin activation during Drosophila development*. J Cell Sci. **123**(Pt 12): p. 2058-67.
4. Morin, X. and Y. Bellaïche, *Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development*. Dev Cell. **21**(1): p. 102-19.
5. Doxsey, S., W. Zimmerman, and K. Mikule, *Centrosome control of the cell cycle*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(6): p. 303-11.
6. Mullins, J.M. and J.R. McIntosh, *Isolation and initial characterization of the mammalian midbody*. J Cell Biol, 1982. **94**(3): p. 654-61.
7. Paweletz, N., *Walther Flemming: pioneer of mitosis research*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(1): p. 72-5.
8. Eggert, U.S., T.J. Mitchison, and C.M. Field, *Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms*. Annu Rev Biochem, 2006. **75**: p. 543-66.
9. Castrillon, D.H. and S.A. Wasserman, *Diaphanous is required for cytokinesis in Drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene*. Development, 1994. **120**(12): p. 3367-77.
10. Zigmond, S.H., *Formin-induced nucleation of actin filaments*. Curr Opin Cell Biol, 2004. **16**(1): p. 99-105.
11. Watanabe, N., et al., *p140mDia, a mammalian homolog of Drosophila diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin*. Embo J, 1997. **16**(11): p. 3044-56.
12. Narumiya, S. and S. Yasuda, *Rho GTPases in animal cell mitosis*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(2): p. 199-205.
13. Ueda, K., et al., *Rho-kinase contributes to diphosphorylation of myosin II regulatory light chain in nonmuscle cells*. Oncogene, 2002. **21**(38): p. 5852-60.
14. Jordan, P. and R. Karess, *Myosin light chain-activating phosphorylation sites are required for oogenesis in Drosophila*. J Cell Biol, 1997. **139**(7): p. 1805-19.
15. Kawano, Y., et al., *Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo*. J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 1023-38.
16. Winter, C.G., et al., *Drosophila Rho-associated kinase (Drok) links Frizzled-mediated planar cell polarity signaling to the actin cytoskeleton*. Cell, 2001. **105**(1): p. 81-91.
17. McNally, F.J., *Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(1): p. 23-9.
18. Belmont, L.D., et al., *Real-time visualization of cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in cytoplasmic extracts*. Cell, 1990. **62**(3): p. 579-89.
19. Valiron, O., N. Caudron, and D. Job, *Microtubule dynamics*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(14): p. 2069-84.
20. Melki, R., et al., *Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies*. Biochemistry, 1989. **28**(23): p. 9143-52.
21. Chretien, D. and R.H. Wade, *New data on the microtubule surface lattice*. Biol Cell, 1991. **71**(1-2): p. 161-74.
22. Mitchison, T. and M. Kirschner, *Dynamic instability of microtubule growth*. Nature, 1984. **312**(5991): p. 237-42.
23. Rice, L.M., E.A. Montabana, and D.A. Agard, *The lattice as allosteric effector: structural studies of alpha-tubulin and gamma-tubulin clarify the role of GTP in microtubule assembly*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5378-83.

24. Desai, A. and T.J. Mitchison, *Microtubule polymerization dynamics*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997. **13**: p. 83-117.
25. Sablin, E.P., *Kinesins and microtubules: their structures and motor mechanisms*. Curr Opin Cell Biol, 2000. **12**(1): p. 35-41.
26. Hirokawa, N., R. Nitta, and Y. Okada, *The mechanisms of kinesin motor motility: lessons from the monomeric motor KIF1A*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(12): p. 877-84.
27. Hirokawa, N., et al., *Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo*. J Cell Biol, 1990. **111**(3): p. 1027-37.
28. Vaisberg, E.A., M.P. Koonce, and J.R. McIntosh, *Cytoplasmic dynein plays a role in mammalian mitotic spindle formation*. J Cell Biol, 1993. **123**(4): p. 849-58.
29. Steuer, E.R., et al., *Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores*. Nature, 1990. **345**(6272): p. 266-8.
30. Heald, R., et al., *Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in Xenopus egg extracts*. Nature, 1996. **382**(6590): p. 420-5.
31. Heald, R., et al., *Spindle assembly in Xenopus egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization*. J Cell Biol, 1997. **138**(3): p. 615-28.
32. Merdes, A., et al., *A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly*. Cell, 1996. **87**(3): p. 447-58.
33. Merdes, A., et al., *Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA*. J Cell Biol, 2000. **149**(4): p. 851-62.
34. Walczak, C.E., et al., *A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity*. Curr Biol, 1998. **8**(16): p. 903-13.
35. Tulu, U.S., N.M. Rusan, and P. Wadsworth, *Peripheral, non-centrosome-associated microtubules contribute to spindle formation in centrosome-containing cells*. Curr Biol, 2003. **13**(21): p. 1894-9.
36. Rusan, N.M., et al., *Reorganization of the microtubule array in prophase/prometaphase requires cytoplasmic dynein-dependent microtubule transport*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 997-1003.
37. Goshima, G. and R.D. Vale, *The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the Drosophila S2 cell line*. J Cell Biol, 2003. **162**(6): p. 1003-16.
38. Matuliene, J., et al., *Function of a minus-end-directed kinesin-like motor protein in mammalian cells*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 22): p. 4041-50.
39. Applewhite, D.A., et al., *The spectraplakins Short stop is an actin-microtubule cross-linker that contributes to organization of the microtubule network*. Mol Biol Cell. **21**(10): p. 1714-24.
40. Busson, S., et al., *Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells*. Curr Biol, 1998. **8**(9): p. 541-4.
41. Hara, K., P. Tydeman, and M. Kirschner, *A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in Xenopus eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(1): p. 462-6.
42. Harris, A., *Location of cellular adhesions to solid substrata*. Dev Biol, 1973. **35**(1): p. 97-114.
43. Sanger, J.M., A.M. Reingold, and J.W. Sanger, *Cell surface changes during mitosis and cytokinesis of epithelial cells*. Cell Tissue Res, 1984. **237**(3): p. 409-17.
44. Cramer, L.P. and T.J. Mitchison, *Investigation of the mechanism of retraction of the cell margin and rearward flow of nodules during mitotic cell rounding*. Mol Biol Cell, 1997. **8**(1): p. 109-19.

45. Yoneda, M. and K. Dan, *Tension at the surface of the dividing sea-urchin egg*. J Exp Biol, 1972. **57**(3): p. 575-87.
46. Matzke, R., K. Jacobson, and M. Radmacher, *Direct, high-resolution measurement of furrow stiffening during division of adherent cells*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(6): p. 607-10.
47. Kunda, P., et al., *Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis*. Curr Biol, 2008. **18**(2): p. 91-101.
48. Sanger, J.M., et al., *Stress fiber and cleavage furrow formation in living cells microinjected with fluorescently labeled alpha-actinin*. Cell Motil Cytoskeleton, 1987. **7**(3): p. 209-20.
49. Hock, R.S., J.M. Sanger, and J.W. Sanger, *Talin dynamics in living microinjected nonmuscle cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 1989. **14**(2): p. 271-87.
50. Yamakita, Y., et al., *Dissociation of FAK/p130(CAS)/c-Src complex during mitosis: role of mitosis-specific serine phosphorylation of FAK*. J Cell Biol, 1999. **144**(2): p. 315-24.
51. They, M., et al., *Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 493-6.
52. They, M., et al., *The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(10): p. 947-53.
53. Mitchison, T.J., *Actin based motility on retraction fibers in mitotic PtK2 cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 1992. **22**(2): p. 135-51.
54. They, M. and M. Bornens, *Cell shape and cell division*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 648-57.
55. Fink, J., et al., *External forces control mitotic spindle positioning*. Nat Cell Biol. **13**(7): p. 771-8.
56. Peterson, L.J., et al., *Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(7): p. 3497-508.
57. Maddox, A.S. and K. Burridge, *RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 255-65.
58. Bishop, A.L. and A. Hall, *Rho GTPases and their effector proteins*. Biochem J, 2000. **348 Pt 2**: p. 241-55.
59. Maekawa, M., et al., *Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase*. Science, 1999. **285**(5429): p. 895-8.
60. Sumi, T., et al., *Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2*. J Cell Biol, 1999. **147**(7): p. 1519-32.
61. Amano, M., et al., *Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20246-9.
62. Kimura, K., et al., *Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)*. Science, 1996. **273**(5272): p. 245-8.
63. Carreno, S., et al., *Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells*. J Cell Biol, 2008. **180**(4): p. 739-46.
64. Kamijo, K., et al., *Dissecting the role of Rho-mediated signaling in contractile ring formation*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(1): p. 43-55.
65. Yonemura, S., K. Hirao-Minakuchi, and Y. Nishimura, *Rho localization in cells and tissues*. Exp Cell Res, 2004. **295**(2): p. 300-14.
66. Hickson, G.R., A. Echard, and P.H. O'Farrell, *Rho-kinase controls cell shape changes during cytokinesis*. Curr Biol, 2006. **16**(4): p. 359-70.

67. Matsumura, F., et al., *Specific localization of serine 19 phosphorylated myosin II during cell locomotion and mitosis of cultured cells.* J Cell Biol, 1998. **140**(1): p. 119-29.
68. Dean, S.O. and J.A. Spudich, *Rho kinase's role in myosin recruitment to the equatorial cortex of mitotic Drosophila S2 cells is for myosin regulatory light chain phosphorylation.* PLoS One, 2006. **1**: p. e131.
69. Morton, W.M., K.R. Ayscough, and P.J. McLaughlin, *Latrunculin alters the actin-monomer subunit interface to prevent polymerization.* Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 376-8.
70. Hickson, G.R. and P.H. O'Farrell, *Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis.* J Cell Biol, 2008. **180**(2): p. 285-94.
71. Balasubramanian, M.K., E. Bi, and M. Glotzer, *Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells.* Curr Biol, 2004. **14**(18): p. R806-18.
72. Uyeda, T.Q., A. Nagasaki, and S. Yumura, *Multiple parallelisms in animal cytokinesis.* Int Rev Cytol, 2004. **240**: p. 377-432.
73. Bement, W.M., H.A. Benink, and G. von Dassow, *A microtubule-dependent zone of active RhoA during cleavage plane specification.* J Cell Biol, 2005. **170**(1): p. 91-101.
74. Wadsworth, P., *Cytokinesis: Rho marks the spot.* Curr Biol, 2005. **15**(21): p. R871-4.
75. Prokopenko, S.N., et al., *A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in Drosophila.* Genes Dev, 1999. **13**(17): p. 2301-14.
76. Kitamura, T., et al., *Role of MgcRacGAP/Cyk4 as a regulator of the small GTPase Rho family in cytokinesis and cell differentiation.* Cell Struct Funct, 2001. **26**(6): p. 645-51.
77. Hirose, K., et al., *MgcRacGAP is involved in cytokinesis through associating with mitotic spindle and midbody.* J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 5821-8.
78. Kimura, K., et al., *Accumulation of GTP-bound RhoA during cytokinesis and a critical role of ECT2 in this accumulation.* J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17233-6.
79. Tatsumoto, T., et al., *Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis.* J Cell Biol, 1999. **147**(5): p. 921-8.
80. Jantsch-Plunger, V., et al., *CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis.* J Cell Biol, 2000. **149**(7): p. 1391-404.
81. Mishima, M., S. Kaitna, and M. Glotzer, *Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity.* Dev Cell, 2002. **2**(1): p. 41-54.
82. Nislow, C., et al., *A plus-end-directed motor enzyme that moves antiparallel microtubules in vitro localizes to the interzone of mitotic spindles.* Nature, 1992. **359**(6395): p. 543-7.
83. Zhu, C., et al., *Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference.* Mol Biol Cell, 2005. **16**(7): p. 3187-99.
84. Moriyama, K., K. Iida, and I. Yahara, *Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin.* Genes Cells, 1996. **1**(1): p. 73-86.
85. Fujiwara, K., M.E. Porter, and T.D. Pollard, *Alpha-actinin localization in the cleavage furrow during cytokinesis.* J Cell Biol, 1978. **79**(1): p. 268-75.
86. Murthy, K. and P. Wadsworth, *Myosin-II-dependent localization and dynamics of F-actin during cytokinesis.* Curr Biol, 2005. **15**(8): p. 724-31.
87. Yumura, S., *Myosin II dynamics and cortical flow during contractile ring formation in Dictyostelium cells.* J Cell Biol, 2001. **154**(1): p. 137-46.

88. Cao, L.G. and Y.L. Wang, *Signals from the spindle midzone are required for the stimulation of cytokinesis in cultured epithelial cells*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(2): p. 225-32.
89. Adams, R.R., et al., *pavarotti encodes a kinesin-like protein required to organize the central spindle and contractile ring for cytokinesis*. Genes Dev, 1998. **12**(10): p. 1483-94.
90. Somers, W.G. and R. Saint, *A RhoGEF and Rho family GTPase-activating protein complex links the contractile ring to cortical microtubules at the onset of cytokinesis*. Dev Cell, 2003. **4**(1): p. 29-39.
91. Matsumura, F., *Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(7): p. 371-7.
92. Bonaccorsi, S., M.G. Giansanti, and M. Gatti, *Spindle self-organization and cytokinesis during male meiosis in asterless mutants of Drosophila melanogaster*. J Cell Biol, 1998. **142**(3): p. 751-61.
93. Robinson, D.N. and J.A. Spudich, *Towards a molecular understanding of cytokinesis*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(6): p. 228-37.
94. Canman, J.C. and W.M. Bement, *Microtubules suppress actomyosin-based cortical flow in Xenopus oocytes*. J Cell Sci, 1997. **110** (Pt 16): p. 1907-17.
95. D'Avino, P.P., M.S. Savoian, and D.M. Glover, *Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 8): p. 1549-58.
96. Dan, K. and J.C. Dan, *Behavior of the cell surface during cleavage; on the division mechanism of cells with excentric nuclei*. Biol Bull, 1947. **93**(2): p. 139-62.
97. Noguchi, T. and I. Mabuchi, *Reorganization of actin cytoskeleton at the growing end of the cleavage furrow of Xenopus egg during cytokinesis*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 2): p. 401-12.
98. Cao, L.G. and Y.L. Wang, *Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. II. Cortical movement of microinjected actin filaments*. J Cell Biol, 1990. **111**(5 Pt 1): p. 1905-11.
99. Cao, L.G. and Y.L. Wang, *Mechanism of the formation of contractile ring in dividing cultured animal cells. I. Recruitment of preexisting actin filaments into the cleavage furrow*. J Cell Biol, 1990. **110**(4): p. 1089-95.
100. Wang, Y.L., J.D. Silverman, and L.G. Cao, *Single particle tracking of surface receptor movement during cell division*. J Cell Biol, 1994. **127**(4): p. 963-71.
101. DeBiasio, R.L., et al., *Myosin II transport, organization, and phosphorylation: evidence for cortical flow/solution-contraction coupling during cytokinesis and cell locomotion*. Mol Biol Cell, 1996. **7**(8): p. 1259-82.
102. Prothero, J.W. and D. Spencer, *A model of blebbing in mitotic tissue culture cells*. Biophys J, 1968. **8**(1): p. 41-51.
103. Bruges, J., et al., *Dynamical organization of the cytoskeletal cortex probed by micropipette aspiration*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(35): p. 15415-20.
104. Maugis, B., et al., *Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility*. J Cell Sci. **123**(Pt 22): p. 3884-92.
105. Charras, G.T., et al., *Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells*. Nature, 2005. **435**(7040): p. 365-9.
106. Charras, G.T., et al., *Life and times of a cellular bleb*. Biophys J, 2008. **94**(5): p. 1836-53.
107. Rankin, K.E. and L. Wordeman, *Long astral microtubules uncouple mitotic spindles from the cytokinetic furrow*. J Cell Biol. **190**(1): p. 35-43.

108. Charras, G.T., et al., *Reassembly of contractile actin cortex in cell blebs*. J Cell Biol, 2006. **175**(3): p. 477-90.
109. Charras, G.T., *A short history of blebbing*. J Microsc, 2008. **231**(3): p. 466-78.
110. Tinevez, J.Y., et al., *Role of cortical tension in bleb growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18581-6.
111. Fackler, O.T. and R. Grosse, *Cell motility through plasma membrane blebbing*. J Cell Biol, 2008. **181**(6): p. 879-84.
112. Kikuchi, S., et al., *Radixin deficiency causes conjugated hyperbilirubinemia with loss of Mrp2 from bile canalicular membranes*. Nat Genet, 2002. **31**(3): p. 320-5.
113. Saotome, I., M. Curto, and A.I. McClatchey, *Ezrin is essential for epithelial organization and villus morphogenesis in the developing intestine*. Dev Cell, 2004. **6**(6): p. 855-64.
114. Doi, Y., et al., *Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout*. J Biol Chem, 1999. **274**(4): p. 2315-21.
115. Pearson, M.A., et al., *Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain*. Cell, 2000. **101**(3): p. 259-70.
116. Barret, C., et al., *Mutagenesis of the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP(2)) binding site in the NH(2)-terminal domain of ezrin correlates with its altered cellular distribution*. J Cell Biol, 2000. **151**(5): p. 1067-80.
117. Nakamura, F., M.R. Amieva, and H. Furthmayr, *Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets*. J Biol Chem, 1995. **270**(52): p. 31377-85.
118. Gary, R. and A. Bretscher, *Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(8): p. 1061-75.
119. Niggli, V., et al., *Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin*. FEBS Lett, 1995. **376**(3): p. 172-6.
120. Hamada, K., et al., *Structural basis of the membrane-targeting and unmasking mechanisms of the radixin FERM domain*. Embo J, 2000. **19**(17): p. 4449-62.
121. Simons, P.C., et al., *C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(3): p. 561-5.
122. Yonemura, S., et al., *Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 12): p. 2569-80.
123. Fievet, B.T., et al., *Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin*. J Cell Biol, 2004. **164**(5): p. 653-9.
124. Ng, T., et al., *Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility*. Embo J, 2001. **20**(11): p. 2723-41.
125. ten Klooster, J.P., et al., *Mst4 and Ezrin induce brush borders downstream of the Lkb1/Strad/Mo25 polarization complex*. Dev Cell, 2009. **16**(4): p. 551-62.
126. Belkina, N.V., et al., *LOK is a major ERM kinase in resting lymphocytes and regulates cytoskeletal rearrangement through ERM phosphorylation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4707-12.
127. Hipfner, D.R., N. Keller, and S.M. Cohen, *Slik Sterile-20 kinase regulates Moesin activity to promote epithelial integrity during tissue growth*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2243-8.

128. Hughes, S.C. and R.G. Fehon, *Phosphorylation and activity of the tumor suppressor Merlin and the ERM protein Moesin are coordinately regulated by the Slik kinase*. J Cell Biol, 2006. **175**(2): p. 305-13.
129. Bretscher, A., *Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells*. J Cell Biol, 1983. **97**(2): p. 425-32.
130. Tsukita, S., Y. Hieda, and S. Tsukita, *A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization*. J Cell Biol, 1989. **108**(6): p. 2369-82.
131. Kitajiri, S., et al., *Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia*. J Cell Biol, 2004. **166**(4): p. 559-70.
132. Charras, G. and E. Paluch, *Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(9): p. 730-6.
133. Diz-Munoz, A., et al., *Control of directed cell migration in vivo by membrane-to-cortex attachment*. PLoS Biol. **8**(11): p. e1000544.
134. Estecha, A., et al., *Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 19): p. 3492-501.
135. Bluemink, J.G. and S.W. de Laat, *New membrane formation during cytokinesis in normal and cytochalasin B-treated eggs of Xenopus laevis. I. Electron microscope observations*. J Cell Biol, 1973. **59**(1): p. 89-108.
136. Byers, T.J. and P.B. Armstrong, *Membrane protein redistribution during Xenopus first cleavage*. J Cell Biol, 1986. **102**(6): p. 2176-84.
137. Singal, P.K. and E.J. Sanders, *An ultrastructural study of the first cleavage of Xenopus embryos*. J Ultrastruct Res, 1974. **47**(3): p. 433-51.
138. Danilchik, M.V., et al., *Furrow microtubules and localized exocytosis in cleaving Xenopus laevis embryos*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 2): p. 273-83.
139. Shuster, C.B. and D.R. Burgess, *Targeted new membrane addition in the cleavage furrow is a late, separate event in cytokinesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3633-8.
140. Larkin, K. and M.V. Danilchik, *Microtubules are required for completion of cytokinesis in sea urchin eggs*. Dev Biol, 1999. **214**(1): p. 215-26.
141. Sawai, T. and A. Yomota, *Cleavage plane determination in amphibian eggs*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **582**: p. 40-9.
142. Larkin, K. and M.V. Danilchik, *Three-dimensional Analysis of Laser Scanning Confocal Microscope Sections Reveals an Array of Microtubules in the Cleavage Furrow of Sea Urchin Eggs*. Microsc Microanal, 2001. **7**(3): p. 265-275.
143. Jesuthasan, S., *Furrow-associated microtubule arrays are required for the cohesion of zebrafish blastomeres following cytokinesis*. J Cell Sci, 1998. **111** (Pt 24): p. 3695-703.
144. Echard, A., et al., *Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen*. Curr Biol, 2004. **14**(18): p. 1685-93.
145. Chen, X.W., et al., *RalA-exocyst-dependent recycling endosome trafficking is required for the completion of cytokinesis*. J Biol Chem, 2006. **281**(50): p. 38609-16.
146. Kouranti, I., et al., *Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis*. Curr Biol, 2006. **16**(17): p. 1719-25.
147. Boucrot, E. and T. Kirchhausen, *Endosomal recycling controls plasma membrane area during mitosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(19): p. 7939-44.
148. Mullins, J.M. and J.J. Biesele, *Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells*. J Cell Biol, 1977. **73**(3): p. 672-84.

149. Schweitzer, J.K., et al., *Endocytosis resumes during late mitosis and is required for cytokinesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(50): p. 41628-35.
150. Gerald, N.J., et al., *Cytokinesis failure in clathrin-minus cells is caused by cleavage furrow instability*. Cell Motil Cytoskeleton, 2001. **48**(3): p. 213-23.
151. Thompson, H.M., et al., *The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis*. Curr Biol, 2002. **12**(24): p. 2111-7.
152. Baluska, F., D. Menzel, and P.W. Barlow, *Cytokinesis in plant and animal cells: endosomes 'shut the door'*. Dev Biol, 2006. **294**(1): p. 1-10.
153. Albertson, R., B. Riggs, and W. Sullivan, *Membrane traffic: a driving force in cytokinesis*. Trends Cell Biol, 2005. **15**(2): p. 92-101.
154. Zerial, M. and H. McBride, *Rab proteins as membrane organizers*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(2): p. 107-17.
155. Schwartz, S.L., et al., *Rab GTPases at a glance*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 22): p. 3905-10.
156. Skop, A.R., et al., *Dissection of the mammalian midbody proteome reveals conserved cytokinesis mechanisms*. Science, 2004. **305**(5680): p. 61-6.
157. Boucrot, E. and T. Kirchhausen, *Mammalian cells change volume during mitosis*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1477.
158. Di Paolo, G. and P. De Camilli, *Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics*. Nature, 2006. **443**(7112): p. 651-7.
159. Field, S.J., et al., *PtdIns(4,5)P2 functions at the cleavage furrow during cytokinesis*. Curr Biol, 2005. **15**(15): p. 1407-12.
160. Emoto, K., et al., *Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 37901-7.
161. Wong, R., et al., *PIP2 hydrolysis and calcium release are required for cytokinesis in Drosophila spermatocytes*. Curr Biol, 2005. **15**(15): p. 1401-6.
162. Echard, A., *Membrane traffic and polarization of lipid domains during cytokinesis*. Biochem Soc Trans, 2008. **36**(Pt 3): p. 395-9.
163. Saul, D., et al., *Continuous phosphatidylinositol metabolism is required for cleavage of crane fly spermatocytes*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 17): p. 3887-96.
164. Giansanti, M.G., et al., *Cooperative interactions between the central spindle and the contractile ring during Drosophila cytokinesis*. Genes Dev, 1998. **12**(3): p. 396-410.
165. Somma, M.P., et al., *Molecular dissection of cytokinesis by RNA interference in Drosophila cultured cells*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(7): p. 2448-60.
166. Sechi, A.S. and J. Wehland, *The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 21**: p. 3685-95.
167. Yin, H.L. and P.A. Janmey, *Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 761-89.
168. Yoshida, S., S. Bartolini, and D. Pellman, *Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis*. Genes Dev, 2009. **23**(7): p. 810-23.
169. McGough, A.M., et al., *The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions*. FEBS Lett, 2003. **552**(2-3): p. 75-81.
170. Meberg, P.J., *Signal-regulated ADF/cofilin activity and growth cone motility*. Mol Neurobiol, 2000. **21**(1-2): p. 97-107.
171. Iwasaki, T., et al., *Diphosphorylated MRLC is required for organization of stress fibers in interphase cells and the contractile ring in dividing cells*. Cell Struct Funct, 2001. **26**(6): p. 677-83.
172. Nakamura, H. and H. Ozawa, *Immunolocalization of CD44 and the ERM family in bone cells of mouse tibiae*. J Bone Miner Res, 1996. **11**(11): p. 1715-22.

173. Axton, J.M., et al., *One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in Drosophila is essential for mitosis*. Cell, 1990. **63**(1): p. 33-46.
174. Chen, F., et al., *Multiple protein phosphatases are required for mitosis in Drosophila*. Curr Biol, 2007. **17**(4): p. 293-303.
175. Janetopoulos, C., et al., *Temporal and spatial regulation of phosphoinositide signaling mediates cytokinesis*. Dev Cell, 2005. **8**(4): p. 467-77.
176. Campbell, R.B., F. Liu, and A.H. Ross, *Allosteric activation of PTEN phosphatase by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33617-20.
177. Li, Z., et al., *Regulation of PTEN by Rho small GTPases*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 399-404.
178. Chong, L.D., et al., *The small GTP-binding protein Rho regulates a phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in mammalian cells*. Cell, 1994. **79**(3): p. 507-13.
179. Oude Weernink, P.A., et al., *Stimulation of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase by Rho-kinase*. J Biol Chem, 2000. **275**(14): p. 10168-74.
180. Yang, S.A., C.L. Carpenter, and C.S. Abrams, *Rho and Rho-kinase mediate thrombin-induced phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase trafficking in platelets*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 42331-6.
181. Weernink, P.A., et al., *Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42*. J Biol Chem, 2004. **279**(9): p. 7840-9.
182. Takahashi, K., et al., *Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl*. Oncogene, 1998. **16**(25): p. 3279-84.
183. Sedzinski, J., et al., *Polar actomyosin contractility destabilizes the position of the cytokinetic furrow*. Nature. **476**(7361): p. 462-6.
184. White, J.G. and G.G. Borisy, *On the mechanisms of cytokinesis in animal cells*. J Theor Biol, 1983. **101**(2): p. 289-316.
185. Hird, S.N. and J.G. White, *Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of Caenorhabditis elegans*. J Cell Biol, 1993. **121**(6): p. 1343-55.
186. Naghavi, M.H., et al., *Moesin regulates stable microtubule formation and limits retroviral infection in cultured cells*. Embo J, 2007. **26**(1): p. 41-52.
187. Haedicke, J., et al., *The Ezrin-radixin-moesin family member ezrin regulates stable microtubule formation and retroviral infection*. J Virol, 2008. **82**(9): p. 4665-70.
188. Wakayama, T., et al., *Expression, localization, and binding activity of the ezrin/radixin/moesin proteins in the mouse testis*. J Histochem Cytochem, 2009. **57**(4): p. 351-62.
189. Sakamoto, T., et al., *Mass spectrometric analysis of microtubule co-sedimented proteins from rat brain*. Genes Cells, 2008. **13**(4): p. 295-312.
190. Shestakova, E., J. Vandekerckhove, and J.R. De Mey, *Epithelial and fibroblastoid cells contain numerous cell-type specific putative microtubule-regulating proteins, among which are ezrin and fodrin*. Eur J Cell Biol, 1998. **75**(4): p. 309-20.
191. Vilmos, P., et al., *Live imaging reveals that the Drosophila actin-binding ERM protein, moesin, co-localizes with the mitotic spindle*. Eur J Cell Biol, 2009. **88**(10): p. 609-19.
192. Luxenburg, C., et al., *Developmental roles for Srf, cortical cytoskeleton and cell shape in epidermal spindle orientation*. Nat Cell Biol. **13**(3): p. 203-14.
193. Haren, L. and A. Merdes, *Direct binding of NuMA to tubulin is mediated by a novel sequence motif in the tail domain that bundles and stabilizes microtubules*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 9): p. 1815-24.

194. Peyre, E., et al., *A lateral belt of cortical LGN and NuMA guides mitotic spindle movements and planar division in neuroepithelial cells.* J Cell Biol. **193**(1): p. 141-54.
195. Fant, X., A. Merdes, and L. Haren, *Cell and molecular biology of spindle poles and NuMA.* Int Rev Cytol, 2004. **238**: p. 1-57.
196. Gehmlich, K., L. Haren, and A. Merdes, *Cyclin B degradation leads to NuMA release from dynein/dynactin and from spindle poles.* EMBO Rep, 2004. **5**(1): p. 97-103.
197. Du, Q., et al., *LGN blocks the ability of NuMA to bind and stabilize microtubules. A mechanism for mitotic spindle assembly regulation.* Curr Biol, 2002. **12**(22): p. 1928-33.
198. Zheng, Z., et al., *LGN regulates mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis.* J Cell Biol. **189**(2): p. 275-88.
199. Bowman, S.K., et al., *The Drosophila NuMA Homolog Mud regulates spindle orientation in asymmetric cell division.* Dev Cell, 2006. **10**(6): p. 731-42.
200. Fuja, T.J., et al., *Asymmetric localization of LGN but not AGS3, two homologs of Drosophila pins, in dividing human neural progenitor cells.* J Neurosci Res, 2004. **75**(6): p. 782-93.
201. Serrador, J.M., et al., *A juxta-membrane amino acid sequence of P-selectin glycoprotein ligand-1 is involved in moesin binding and ezrin/radixin/moesin-directed targeting at the trailing edge of migrating lymphocytes.* Eur J Immunol, 2002. **32**(6): p. 1560-6.
202. Serrador, J.M., et al., *A novel serine-rich motif in the intercellular adhesion molecule 3 is critical for its ezrin/radixin/moesin-directed subcellular targeting.* J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 10400-9.
203. Schmid, A.C., et al., *Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation.* FEBS Lett, 2004. **576**(1-2): p. 9-13.
204. Dambournet, D., et al., *Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis.* Nat Cell Biol.
205. Straight, A.F., C.M. Field, and T.J. Mitchison, *Anillin binds nonmuscle myosin II and regulates the contractile ring.* Mol Biol Cell, 2005. **16**(1): p. 193-201.
206. Low, S.H., et al., *Syntaxin 2 and endobrevin are required for the terminal step of cytokinesis in mammalian cells.* Dev Cell, 2003. **4**(5): p. 753-9.
207. Brill, J.A., et al., *A phospholipid kinase regulates actin organization and intercellular bridge formation during germline cytokinesis.* Development, 2000. **127**(17): p. 3855-64.
208. Toyoshima, F., et al., *PtdIns(3,4,5)P3 regulates spindle orientation in adherent cells.* Dev Cell, 2007. **13**(6): p. 796-811.
209. Gachet, Y. and S. Tournier, *Lost your orientation? Find your way with PtdIns(3,4,5)P3!* Dev Cell, 2007. **13**(6): p. 753-4.
210. Lowe, M., *Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1.* Traffic, 2005. **6**(9): p. 711-9.
211. Khanna, C., et al., *The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis.* Nat Med, 2004. **10**(2): p. 182-6.
212. Yu, Y., et al., *Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators.* Nat Med, 2004. **10**(2): p. 175-81.
213. Elliott, B.E., et al., *The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells.* Breast Cancer Res, 2005. **7**(3): p. R365-73.

AUTEUR : Chantal Roubinet

TITRE : Rôles et régulation du PI(4,5)P2 dans le remodelage cortical et la morphogénèse cellulaire en mitose.

DIRECTEURS DE THESE : François Payre et Sébastien Carréno

RESUME :

La division cellulaire est un événement fondamental, indispensable au développement embryonnaire et à l'homéostasie des organismes. Il s'agit d'un processus complexe qui doit être précisément contrôlé dans le temps et dans l'espace pour permettre la formation de deux cellules filles, au contenu génétique identique à celui de la cellule mère. Ceci requiert une coordination entre la ségrégation des chromosomes, opérée par les microtubules, et le clivage de la cellule mère, engageant une réorganisation dynamique du cytosquelette d'Actine. La modification de la forme des cellules en cours de division est en effet due au remodelage du cortex cellulaire, incluant la membrane plasmique et le réseau de filaments d'Actine sous-jacent. Bien que cette série de modifications morphologiques du cortex soit indispensable au déroulement correct de la division cellulaire, les mécanismes moléculaires du contrôle de l'organisation corticale en mitose restent mal caractérisés.

Le PI(4,5)P2 est un phosphoinositide constituant de la membrane plasmique, notamment nécessaire à la division cellulaire. Nos travaux chez la drosophile mettent en évidence que ce phospholipide présente une distribution dynamique, homogène sur l'ensemble du cortex à l'entrée en mitose, puis se concentrant à l'équateur des cellules après la séparation des deux lots de chromosomes. Nous montrons que le PI(4,5)P2 est nécessaire au contrôle de la stabilité corticale et du fuseau mitotique, au moins en partie par son rôle favorisant l'activation de la dMoésine. La dMoésine régule l'interaction entre les filaments d'Actine et la membrane plasmique, jouant un rôle clé dans l'organisation locale du cortex des cellules en mitose et dans la régulation de ses propriétés mécaniques. Nous montrons que l'interaction PI(4,5)P2/dMoésine participe à la contraction cellulaire à l'entrée en mitose, puis à l'élongation cellulaire caractéristique des étapes plus tardives de la division. A la fin de la mitose, nous montrons que la phosphatase Pp1-87B inactive la dMoésine, indispensable à la relaxation du cortex des cellules en interphase.

Par un crible fonctionnel systématique, nous avons recherché l'ensemble des facteurs indispensables à la production et à l'enrichissement du PI(4,5)P2 au cortex mitotique. Nous mettons en évidence le rôle majeur de deux voies de biosynthèse, qui agissent en synergie pour produire localement du PI(4,5)P2 à la membrane plasmique au cours de la mitose. Leur absence prévient l'activation et le recrutement membranaire de la dMoésine, et conduit à une instabilité corticale associée à des défauts du fuseau mitotique. Une troisième voie, nécessitant l'activité de la protéine dOcr1, contribue à l'homéostasie de ce phosphoinositide, en dégradant le PI(4,5)P2 présent sur les membranes internes de la cellule. L'inactivation de dOcr1 empêche la formation normale et l'ingression du sillon de clivage.

Ensemble, ces résultats ont permis de mettre en évidence de nouveaux régulateurs de la membrane plasmique et de son interaction avec le cytosquelette d'Actine, permettant de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent le remodelage cortical et les modifications de forme cellulaire qui ont lieu au cours de la mitose.

SPECIALITES : Thèse en Cotutelle.

Cancérologie (Université Toulouse III, France) ; Biologie Moléculaire (Université de Montréal, Québec)

INTITULE ET ADRESSE DES LABORATOIRES :

Centre de Biologie du Développement (CBD)
118 route de Narbonne,
31062 Toulouse,
France

Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie
(IRIC)
2950 chemin de Polytechnique,
H3T1J4 Montréal,
Québec, Canada