



Université de Montréal

**Caractérisation du nouveau rôle de la phosphatase dOCRL  
durant la division cellulaire**

Par Khaled Ben El Kadhi

Programme de biologie moléculaire  
Faculté de médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en biologie moléculaire

Mai, 2017

© Khaled Ben El Kadhi, 2017



## Résumé

La cytokinèse est un processus dynamique qui requiert un couplage précis des forces générées par l'actomyosine avec la membrane plasmique. En métaphase, l'association uniforme de ces forces avec la membrane plasmique permet l'arrondissement cellulaire caractéristique de cette étape. En revanche, durant l'anaphase l'enrichissement de la machinerie de cytokinèse au niveau de l'équateur cellulaire permet la formation du sillon de clivage. Les mécanismes régulant le recrutement équatorial de la machinerie de cytokinèse ne sont pas encore totalement élucidés. Notre travail a démontré que le phosphoinositide PI(4,5)P2 agit comme un repère spatial pour le recrutement de la machinerie de cytokinèse. En effet, lorsque la 5-phosphatase dOCRL est déplétée dans les cellules S2 de drosophile, l'accumulation de PI(4,5)P2 au niveau des endomembranes recrute ectopiquement la machinerie de cytokinèse. dOCRL est l'orthologue de la protéine OCRL1 humaine. Des mutations sur le gène *OCRL* sont responsables du syndrome de Lowe. Ce dernier est une maladie génétique rare liée au chromosome X. Des recherches plus poussées nous ont permis de décrire une nouvelle fonction de la phosphatase PTEN qui sauve les manifestations cellulaires du syndrome de Lowe. Notre travail pourrait représenter une potentielle avenue thérapeutique pour traiter cette maladie.

**Mots-clés** : cytokinèse, syndrome de Lowe, PTEN, OCRL1, PhosphoInositides, PLC



## **Abstract**

Cytokinesis is a dynamic process that requires a precise coupling of actomyosin forces with the plasma membrane. In metaphase, a uniform distribution of actomyosin forces through the plasma membrane allows the characteristic cell rounding. During anaphase, the cytokinetic machinery becomes concentrated at the equatorial cortex to allow the cleavage furrow formation. The mechanisms underlying the localization of the cleavage furrow are not fully understood. Here we demonstrate that the phosphoinositide PI(4,5)P<sub>2</sub> acts as a spatial cue for cytokinetic machinery recruitment. We have shown in *Drosophila* S2 cells that when the 5-phosphatase dOCRL is knocked down, ectopic accumulation of PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes recruits the cytokinetic machinery. dOCRL is the ortholog of the human OCRL1 protein. Mutation in OCRL gene is responsible for Lowe syndrome, a rare, multisystemic X-linked disorder. Our further investigations demonstrated a new and unexpected function of the phosphatase PTEN that rescued the cellular manifestation of the Lowe syndrome. This work allowed us to find a small molecule capable of rescuing the cellular and *in vivo* manifestations of Lowe syndrome. Our results could represent a new therapeutic avenue to treat this disease.

**Keywords** : cytokinesis, Lowe syndrome, PTEN, OCRL1, PhosphoInositides, PLC

# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des sigles.....	xi
Remerciements.....	xiv
Introduction.....	16
1.1 La mitose.....	16
1.1.1 La prophase.....	16
1.1.2 La prométaphase.....	17
1.1.3 La métaphase.....	18
1.1.4 L'anaphase.....	18
1.1.5 La telophase.....	19
1.2 La cytokinèse.....	20
1.2.1 Arrondissement des cellules en métaphase.....	20
1.2.2 RhoA Régulateurs clé de la cytokinèse.....	21
1.2.3 Le central spindle agit comme activateur de RhoA.....	22
1.2.3.1 La centralspindline.....	22
1.2.3.2 Le CPC.....	23
1.2.3.3 Le PRC1.....	23
1.2.3.4 Activation de RhoA.....	24
1.2.3.4.1 Ect2.....	24
1.2.3.4.2 L'activité GAP de MgcRacGAP.....	25
1.2.4 Fonctions de RhoA dans l'assemblage du sillon de clivage.....	25
1.2.5 L'abscission.....	27
1.2.6 Rôle des microtubules dans le positionnement de l'axe de division.....	27
1.2.7 Quel est le rôle du PI(4,5)P2 dans la localisation du sillon de clivage?.....	28
1.3 Phosphoinositides.....	30
1.3.1 Le PI(4,5)P2.....	34
1.3.1.1 Le recrutement de la machinerie de cytokinèse.....	34

1.3.1.1.1 RhoA.....	34
1.3.1.1.2 Ect2.....	35
1.3.1.1.3 Anilline .....	35
1.3.1.1.4 Les ERM.....	36
1.3.1.1.5 MgcRacGAP.....	37
1.3.1.2 Régulation du cytosquelette l'actine.....	37
1.3.1.2.1 Arp2/3.....	38
1.3.1.2.2 ADF/Cofiline.....	39
1.3.1.2.3 Gelsoline.....	39
1.3.2 Le métabolisme du PI(4,5)P2.....	39
1.3.2.1 PLC.....	40
1.3.2.1.1 Structure des PLC.....	41
1.3.2.1.1.1 Le domaine PH.....	41
1.3.2.1.1.2 Les mains EF.....	42
1.3.2.1.1.3 Le tonneau TIM.....	42
1.3.2.1.1.4 Le domaine C2.....	43
1.3.2.1.2 Activation des PLC.....	43
1.3.2.2 PTEN.....	44
1.3.2.2.1 La structure de PTEN.....	44
1.3.2.2.1.1 Le domaine de liaison au PI(4,5)P2 (PBD).....	45
1.3.2.2.1.2 Le domaine phosphatase.....	45
1.3.2.2.1.3 Le domaine C2 .....	47
1.3.2.2.1.4 Le domaine C-terminal.....	48
1.3.2.2.2 Fonctions de PTEN.....	48
1.3.2.2.2.1 Polarité cellulaire et migration.....	49
1.3.2.2.2.2 Prolifération, survie et métabolisme.....	50
1.3.2.2.2.3 Fonctions de PTEN dans le noyau.....	51
1.3.2.2.2.3.1 Préserver la stabilité génomique.....	52
1.3.2.2.2.3.2 Réparation de l'ADN.....	52
1.3.2.2.2.3.3 Régulation du cycle cellulaire.....	52
1.3.2.2.2.3.4 Translocation de PTEN dans le noyau.....	53

1.3.2.3 OCRL1 .....	54
1.3.2.3.1 Structure d'OCRL1 .....	55
1.3.2.3.1.1 Le domaine PH .....	55
1.3.2.3.1.2 Le domaine phosphatase .....	56
1.3.2.3.1.3 Le domaine ASH .....	57
1.3.2.3.1.4 Le domaine Rho-GAP like .....	57
1.3.2.3.2 Fonctions dOCRL1 .....	58
1.3.2.3.2.1 Remodelage du cytosquelette d'actine .....	58
1.3.2.3.2.2 Trafic membranaire .....	59
1.3.2.3.2.3 Migration cellulaire .....	60
1.3.2.3.2.4 Ciliogénèse .....	61
1.3.2.3.2.5 Phagocytose .....	62
1.3.2.3.2.6 Cytocinèse .....	62
1.3.2.3.3 Le syndrome de Lowe .....	63
2 The Inositol 5-Phosphatase dOCRL Controls PI(4,5)P2 Homeostasis and Is Necessary for Cytokinesis .....	69
2.1 Summary .....	72
2.2 Highlights .....	73
2.3 Results and discussion .....	73
2.3.1 dOCRL, the Drosophila Ortholog of OCRL1, Is Required for Cell Division .....	73
2.3.2 dOCRL Is Associated with Endocytic Compartments .....	74
2.3.3 dOCRL Controls PI(4,5)P2 Homeostasis .....	74
2.3.4 dOCRL Is Required for Proper Furrowing of the Contractile Ring .....	75
2.3.5 dOCRL Is Required for the Proper Assembly of Components of the Cytokinetic Machinery .....	76
2.4 Supplemental Experimental Procedures .....	78
2.4.1 DNA Constructs .....	78
2.4.2 Cell Culture and dsRNA Treatment .....	78
2.4.3 Primer sequences .....	78
2.4.4 Screening Procedure .....	79
2.4.5 Imaging of Fixed Samples, Time-Lapse Recording, and Measurements .....	79

2.5 Acknowledgments	80
2.6 References	80
2.7 Supplemental References	83
2.8 Figures legends	84
2.9 Figures	87
2.10 The unexpected role of Drosophila OCRL during cytokinesis	95
2.10.1 Abstract	95
2.10.2 OCRL Proteins Regulate Homeostasis of PtdIns(4,5)P2	96
2.10.3 OCRL Proteins and Vesicular Trafficking	97
2.10.4 OCRL Proteins and Cytokinesis	97
2.10.5 Acknowledgments	98
2.10.6 References	99
3 A novel PTEN signaling pathway activates phospholipase C and rescues the cellular manifestations of Lowe syndrome	102
3.1 Summary	105
3.2 Introduction	106
3.3 Results	108
3.3.1 PTEN rescues dOCRL phenotypes independently of its phosphatase activity	108
3.3.2 The PBD and C2 domains of PTEN are necessary and sufficient to rescue the effects of dOCRL depletion	110
3.3.3 A dPLCXD hydrolyzes PI(4,5)P2 on endomembranes downstream of PTEN	110
3.3.4 Defects observed upon OCRL1 depletion can be prevented by chemical activation of PLC	111
3.4 Discussion	113
3.5 Materials and method	116
3.5.1 DNA Constructs	116
3.5.2 S2 Cell culture, dsRNA treatment, transfection and Drug treatment	116
3.5.3 Immunofluorescence	117
3.5.4 Abscission assays in Human cells	117
3.5.5 Zebrafish strains and husbandry	118
3.6 Figures legend	119

3.7 References.....	130
4 Discussion, perspective et conclusion.....	133
5 Bibliographie .....	151

## Liste des tableaux

**Tableau 1** : Domaines des liaisons au PIPs

## Liste des figures

**Figure 1.1** : Représentation schématique des premières étapes de la mitose.

**Figure 1.2** : Représentation schématique des dernières étapes de la mitose.

**Figure 1.3** : Les acteurs importants pour la formation du central spindle.

**Figure 1.4** : Activation de RhoA par la voie de signalisation du central spindle.

**Figure 1.5** : Rôles de RhoA dans la constriction du sillon de clivage.

**Figure 1.6** : Structure chimique des PIPs.

**Figure 1.7** : Métabolismes des PIPs.

**Figure 1.8** : Les liaisons directes entre le PI(4,5)P2 et la machinerie de cytokinèse.

**Figure 1.9** : Régulation de l'actine par le PI(4,5)P2.

**Figure 1.10** : Les familles des PLC.

**Figure 1.11** Représentation schématique des différents domaines de PTEN

**Figure 1.12** : Comparaison structurale du site actif de PTEN, PTP1B et VHR

**Figure 1.13** : Modèle de la régulation conformationnelle de PTEN

**Figure 1.14** : Fonctions cellulaires de PTEN

**Figure 1.15** : Voies de signalisations régulées par PTEN

**Figure 1.16** : Fonctions nucléaires de PTEN

**Figure 1.17** : Représentation schématique des 5-phosphatases contenant un domaine Rho-GAP like

**Figure 1.18** : Comparaison de l'organisation protéique d'OCRL1 et d'INPP5B

**Figure 1.19** : Structure d'OCRL1

**Figure 1.20** : Fonctions cellulaires régulées par OCRL1

**Figure 1.21** : Schématisation des principaux organes touchés par le Syndrome de Lowe

**Figure 1.22** : Modèle de la fonction d'OCRL1 dans le trafic endocytaire de la megalin dans les tubules rénaux

**Figure 3.1**: Production de PI(4,5)P2 sur les endomembranes entre la métaphase et l'anaphase

**Figure 4.1** : enrichissement des vacuoles sur l'axe du sillon de clivage

**Figure 4.2** : Localisation du PI(3,4,5)P3 durant la division cellulaire

**Figure 4.3** Localisation vacuolaire de PBD-C2-mCh



**Figure 4.4** : PBD-C2 se localise au niveau des lysosomes

**Figure 4.5** : PBD-C2-mCh se localise sur les lysosomes marqués par LAMP1

**Figure 4.6** : LA forme entière de PTEN se localise à la membrane plasmique

**Figure 4.7** : Le sauvetage de la déplétion de dOCRL dépend de l'autophagie

**Figure 4.8** : PBD-C2 se localise sur les autophagosomes

**Figure 4.9** : PBD-C2 réduit le nombre d'autophagosome dans les cellules déplétée pour dOCRL

**Figure 4.10** : la surexpression de PBD-C2 réduit l'intensité de fluorescence moyenne de LC3 dans des cellules déplétées pour dOCRL

**Figure 4.11** : localisation partiellement nucléaire de PBD-C2-GFP

**Figure 4.12** : La localisation de dOCRL au pont intercellulaire dépend de Rab35

**Figure 4.13** : PBD-C2-GFP se localise au midbody

**Figure 4.14** : OCRL1b humain sauve la déplétion de dOCRL dans les cellules S2

## Liste des sigles

AA : Acide aminé  
APC : Complexe de promotion de l'anaphase  
ASH : Domaine ASPM-SPD2-Hydin  
CLS : Séquence de localisation cytoplasmique  
CPC : Chromosome Passenger Complex  
DAG : Diacylglycérol  
DUS : Phosphatases à double spécificités  
ER : Réticulum endoplasmique  
ERM : Ezrine Radixine Moesine  
FERM : Bande 4.1 Ezrine-Radexine-Moesine  
FYVE : Domaine Fab1, YOTB/ZK632, Vac1p, and EEA1  
GAP : Protéine activatrice de la fonction GTPase  
GDP : Guanosine di-phosphate  
GEF : Facteur d'échange des guanosine  
Golgi : Appareil de Golgi  
GOLPH3 : Golgi-phosphoprotéine 3  
GPCR : Récepteur couplé aux protéines G  
GSK3 : Glycogène synthase kinase 3  
GTP : Guanosine tri-phosphate  
iARN : Interférence ARN  
IP3 : Inositol tri-phosphate  
MDC : Machinerie de cytokinèse  
MP : Membrane plasmique  
MRLC : Chaîne légère régulatrice de la myosine  
MTOC : Centre organisateur (sans S) des microtubules  
MVP : Protéine de Voute majeure  
NEBD : Rupture de la membrane nucléaire  
NLS : Signal de localisation nucléaire  
OCRL : Oculo Cerebro Renal Lowe syndrome  
OCRL1 : Oculo Cerebro Renal Lowe syndrome protein 1  
PBD : Domaine de liaison au PI(4,5)P2  
PH : Domaine d'homologie à la Plekstrine  
PI : PhosphatidyInositol  
PI(3,4,5)P3 : PhosphatidyInositol 3,4,5 triPhosphates  
PI(3,4)P2 : PhosphatidyInositol 3,4 biPhosphates  
PI(3,5)P2 : PhosphatidyInositol 3,5 biPhosphates  
PI(3)P : PhosphatidyInositol 3-Phosphate  
PI(4,5)P2 : PhosphatidyInositol 4,5 biPhosphates  
PI(4)P : PhosphatidyInositol 4-Phosphate

PI(5)P : Phosphatidylinositol 5-Phosphate  
PIP : Phosphatidylinositols Phosphates  
PKC : Proteine kinase c  
PLC : Phospholipase c  
PRC1 : Protein Required for Cytokinesis 1  
PSL : Patients atteints du syndrome de Lowe  
PTEN : Phosphatase et homologue de TENsine délétée sur le chromosome 10  
PTP : Protéines tyrosines phosphatases  
PX : Phox homology  
ROCK : Kinase associée à la protéine RhoA  
RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase  
SL : Syndrome de Lowe  
SNC : Système nerveux central  
TGN : Réseau trans-Golgi

*À papa...*

## Remerciements

Tout d'abord j'aimerais remercier mon superviseur Sébastien Carréno pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Depuis le début son soutien, son encouragement et son écoute m'ont permis de mener à terme mes travaux. Merci aussi de m'avoir donné de plus en plus de liberté au fil des années et de m'avoir permis de développer une certaine indépendance scientifique. Un grand merci pour ton soutien très humain lors des moments les plus difficiles. Aussi, merci pour tous tes conseils musicaux, gastronomiques et surtout pour tout le chocolat qui nous a permis de tenir jusqu'à la fin.

Ensuite j'aimerais remercier ma merveilleuse femme Nahla. Merci pour ton soutien infailible. Merci de m'avoir enduré et aidé tout au long de ces années. Tu as su m'apporter du courage et de la persévérance quand ils se faisaient rares. Sans toi cette aventure aurait été dénuée de sens, je suis très chanceux de t'avoir dans ma vie.

J'aimerai aussi remercier Barbara qui a été présente depuis le tout début de ce long périple. Au cours de ces années, on a dû discuter de presque tous les sujets possibles et imaginables, dont certains qui m'ont vraiment marqué (tel que Toto le pangolin).

Merci à David, Cédric et Damien, grâce à vous ces dernières années sont passées plus vite. Merci pour vos encouragements et merci d'avoir été là pour moi.

J'aimerais exprimer ma gratitude au Dr Gregory Émery chez qui j'ai réalisé une partie de mes recherches. Bien que de courte durée, mon passage dans ton laboratoire a été très enrichissant pour moi autant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour tes conseils judicieux et pour toutes ces discussions autour de la machine à café.

Aussi un grand merci pour Dr Vincent Archambault, Dr Philippe Roux, Dr Benjamin Kwok, Dr Marc Therrien et tous les membres du flymeeting pour vos conseils et vos critiques constructives.

Je n'oublie pas Fred, Xavier, Dev, Carl, Jalila, Fatiha et tous ceux qui ont rendu cette aventure mémorable.

Un grand merci à ma famille, spécialement ma mère, qui a été toujours présente pour moi.

Un grand merci aux membres passés et présents du laboratoire qui ont contribué à l'avancement de mes recherches.

Je dédie ce travail aux personnes qui nous ont quittés trop tôt...

# 1. Introduction

On estime qu'un corps humain moyen est composé de  $3.72 \times 10^{13}$  cellules (1). En effet, depuis la fécondation de l'ovocyte par un spermatozoïde jusqu'à la mort, on estime que toutes les cellules d'un corps humain se divisent, cumulativement, 100.000.000.000.000.000 de fois (2). Ce qui fait de la division cellulaire un des processus les plus importants pour le développement, la croissance et le maintien de l'intégrité de l'organisme. La division cellulaire est une chorégraphie dynamique précisément régulée qui permet la séparation d'une cellule mère en deux cellules filles génétiquement identiques. L'échec de ce processus peut conduire à une instabilité génétique et pourrait être la première étape de formation de maladie grave telle que le cancer (3).

Depuis la première description de la division cellulaire, au 19ème siècle par Walther Flemming, les chercheurs n'ont pas cessé de vouloir disséquer les voies de signalisation régulant ce processus. Ces travaux, ayant conduit à des dizaines de milliers de publications, nous ont permis de générer une image globale, plus ou moins détaillée, des différentes voies de signalisation impliquées dans ce processus fondamental qui est la mitose. Une résultante de ces travaux est que la mitose est un processus qui est rigoureusement contrôlé sur le plan spatiotemporel afin d'assurer la fidélité de la ségrégation du matériel génétique entre les cellules filles. Malgré ce travail colossal, de nombreuses zones d'ombres persistent encore et de nombreux secrets de la mitose restent encore à découvrir.

## 1.1. Mitose

Dans cette première partie nous allons décrire brièvement, les différentes étapes de la mitose et leurs caractéristiques.

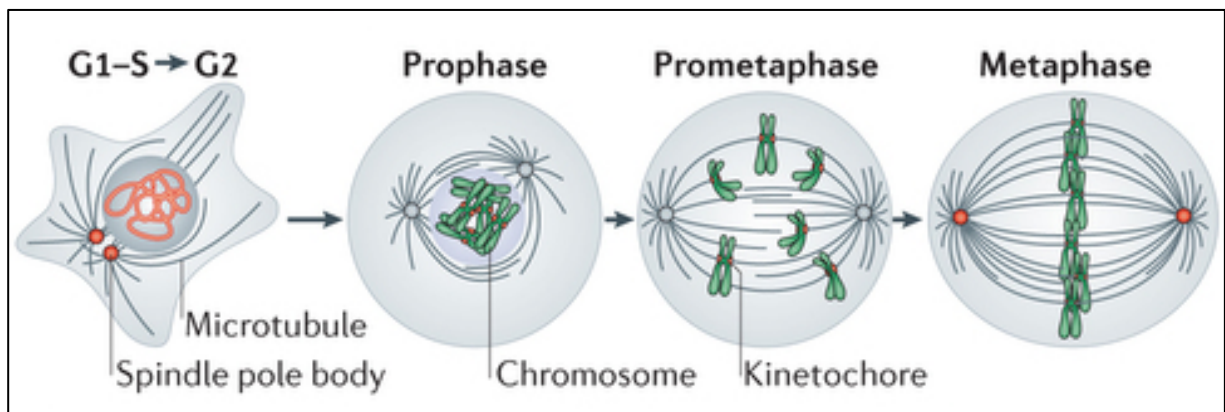
### 1.1.1. Prophase

La première étape de la mitose est la prophase. Durant cette étape la protéine condensine est recrutée sur les chromosomes et commence à condenser les brins d'ADN (4). La cohésine quant à elle, est enlevée de l'extrémité des chromatides sœurs permettant aux bras des chromosomes d'être résolus (4). Au même moment, la cohésine se concentre au niveau du centromère assurant la cohésion des deux chromatides sœurs et empêchant ainsi leur

séparation précoce (4). Le centromère est le lieu d'assemblage des kinétochores qui permettent de lier les chromosomes aux microtubules (5). Au niveau du cytoplasme, les centrosomes qui se sont dupliqués durant l'interphase, commencent à se séparer et à migrer de part et d'autre du noyau (5). Ils joueront, par la suite, le rôle de pôles pour le fuseau mitotique (5).

### 1.1.2. Prometaphase

Dans les cellules avec mitose ouverte, la prometaphase commence par la rupture de la membrane nucléaire (NEBD) (4). Cette dernière, tout comme l'appareil de Golgi (Golgi) et le Réticulum endoplasmique (ER) se fragmente en petites vésicules qui seront distribuées entre les deux cellules filles (6). La NEBD est importante pour le développement du fuseau mitotique (4). En effet, dans les mitoses ouvertes, les centrosomes qui sont les centres organisateurs des microtubules (MTOC), sont situés à l'extérieur du noyau cellulaire (4). De ce fait, les microtubules ne peuvent avoir accès aux chromosomes qu'après la NEBD (4). La prometaphase est une phase du cycle qui est très dynamique (4).



**Figure 1.1** : Représentation schématique des premières étapes de la mitose. [Adaptée de (7)]

Durant cette phase, les microtubules s'assemblent et se désassemblent de façon très rapide (4). La nucléation rapide des microtubules vers le centre des cellules permet de séparer encore plus les centrosomes (8). De plus, les microtubules s'engagent dans un processus de « recherche et capture », afin de s'attacher aux kinétochores des chromosomes (8). Les microtubules se stabilisent lorsque leurs extrémités positives s'attachent à un kinétochore (8). En même temps, un autre microtubule provenant du pôle opposé, se lie de l'autre côté du kinétochore pour former un attachement bipolaire (8). Ce dernier est essentiel à la séparation de chacune des



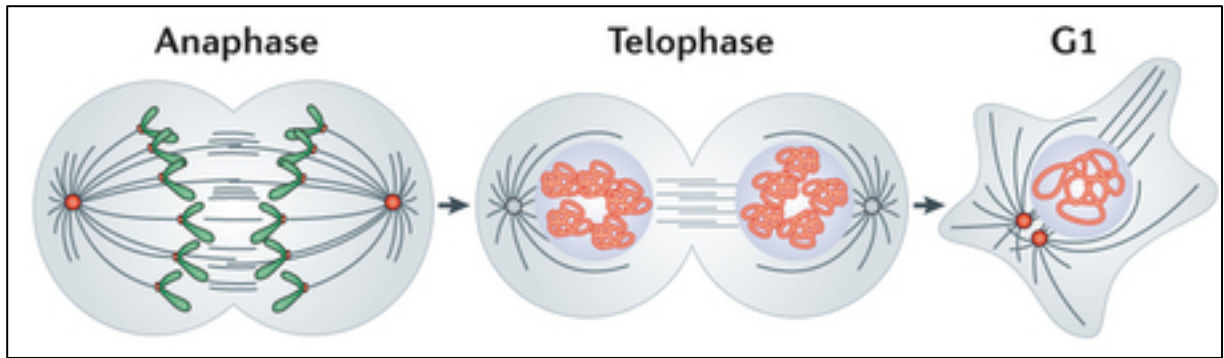
deux chromatides sœurs vers les deux cellules filles (6). Ces microtubules, qui sont maintenant appelés microtubules kinétochoriens, exercent des tensions sur les chromatides sœurs qui seront déplacées dans un mouvement de va-et-vient entre les centrosomes et le centre de la cellule et sur l'axe du fuseau mitotique (4). Durant cette étape les chromatides sœurs restent fermement attachées ensemble grâce à la cohesine qui est présente au niveau du centromère(4).

### **1.1.3. Métaphase**

À cette étape, une réorganisation du cytosquelette d'actine associée à une perte d'adhérence, confère aux cellules une forme sphérique caractéristique de la métaphase (9). Durant cette phase, les microtubules sont séparés en trois catégories : les microtubules kinétochoriens attachés aux chromosomes, les microtubules astraux qui irradient des centrosomes vers la périphérie cellulaire et les microtubules polaires qui se chevauchent au centre de la cellule (5). Une fois l'équilibre de tension entre les microtubules kinétochoriens opposés est atteint, les chromosomes se retrouvent alignés au niveau du centre de la cellule sur l'axe de la plaque métaphasique (8). C'est cette tension exercée sur les chromatides sœurs qui permet d'activer l'anaphase promoting complex (APC) (8).

### **1.1.4. Anaphase**

La transition entre l'anaphase et la métaphase est marquée par la séparation des chromatides sœurs (4). L'activation de l'APC permet deux événements clés : premièrement, elle inactive CDK1 en induisant la dégradation de cycline B (8). Et deuxièmement, elle entraîne l'ubiquitination de la securine qui est par la suite dégradée (8). Cette dégradation active la séparase, une protéase qui va cliver la cohesine et ainsi décoller les deux chromatides sœurs (8). Par la suite, la tension exercée de part et d'autre des chromatides sœurs, par les microtubules, permet leurs déplacements vers des directions opposées (8).



**Figure 1.2** : Représentation schématique des dernières étapes de la mitose. [Adaptée de (7)]

On distingue deux étapes à l'anaphase : l'anaphase A et l'anaphase B (6).

Durant l'anaphase A, les microtubules liés aux kinétochores se dépolymérisent à leurs extrémités positives (6). Ceci permet le transport des chromosomes vers les pôles opposés du fuseau mitotique (6). Durant l'anaphase B, en plus de la force d'attraction exercée par les microtubules kinétochoriens, s'ajoute une force de poussée générée par un glissement entre les microtubules polaires (6, 8). Des kinésines connectent différents microtubules antiparallèles et se déplacent vers l'extrémité positive de ces derniers (8). Ce mouvement aura pour effet de réduire la zone de chevauchement entre les microtubules polaires provenant des deux pôles (6). Ce processus forme le fuseau central (central spindle) (8). Le mouvement généré par le central spindle, aura pour effet d'éloigner encore plus les pôles du fuseau mitotique et d'allonger les cellules (6).

### 1.1.5. Télophase

À la fin de l'anaphase, les deux masses d'ADN identiques atteignent les pôles opposés de la cellule (8). Ensuite, les fragments de la membrane nucléaire re-fusionnent et reforment les membranes nucléaires (6). Ensuite, le ER et le Golgi se reforment pour permettre aux cellules filles d'avoir des organelles fonctionnelles (8, 10). Finalement, les chromosomes qui se retrouvent à l'intérieur du noyau nouvellement formé se décondensent et reviennent à leurs conformations d'interphase (4).

## **1.2. La cytokinèse**

La cytokinèse est la dernière étape de la division cellulaire (11). Elle se définit comme la séparation physique des deux cellules filles après la duplication et la ségrégation spatiale du matériel génétique (12). La cytokinèse est associée à des changements morphologiques (morphogénèse) importants (12). Elle est, en effet, considérée comme un des changements de formes cellulaires les plus dramatiques, nécessitant un remodelage important du cytosquelette cellulaire (11). La cytokinèse commence à l'anaphase B avec la mise en place du sillon de clivage (8). Ce dernier est un anneau contractile composé d'actine et de myosine (8). Il se positionne sous la surface interne de la membrane plasmique et génère une force de constriction qui va permettre la séparation physique des deux cellules filles (8). Durant la télophase, la constriction continue du sillon de clivage compacte progressivement le central spindle pour former le midbody (11). Ce dernier est une organelle importante pour les positionnements des protéines responsables de l'abscission définitive des deux cellules filles (11).

### **1.2.1. Arrondissement des cellules en métaphase : un couteau à double tranchant**

La cytokinèse est un processus très dynamique et très précis (8). Ce dernier, nécessite une synchronisation spatiotemporelle parfaite entre la séparation des chromatides sœurs et la mise en place du sillon du clivage (11). Temporellement, une invagination précoce du sillon de clivage perturberait la séparation des chromatides sœurs (8). Spatialement, le sillon de clivage doit aussi se positionner au bon endroit afin d'obtenir, pour le cas de la division symétrique, deux cellules filles identiques (8).

Le bon positionnement spatial se trouve compliqué par l'arrondissement de la cellule en métaphase. En effet, la forme sphérique qui est nécessaire, dans certaines cellules, pour le bon déroulement de la métaphase peut s'avérer problématique pour la mise en place du sillon de clivage.

Les avantages de cet arrondissement sont de garantir la fidélité de la séparation du matériel génétique en facilitant la recherche et la capture des chromatides sœurs par les microtubules kinétochoriens (9). En effet, la forme sphérique représente la surface minimale pour un volume donné (13). La réduction de la surface de recherche pour les microtubules permet de réduire le temps nécessaire pour la capture des chromosomes (9, 14). Aussi, elle permet de

placer tous les chromosomes dans le rayon de recherche atteignable par les microtubules qui ont une portée maximale, par exemple chez l'ovocytes d'étoile de mer, de 15 à 20  $\mu\text{m}$  (15, 16). Par la suite, cet arrondissement assure le bon fonctionnement du fuseau mitotique (9). Il a été démontré, qu'un défaut d'arrondissement dans certaines cellules en division entraîne la réduction de la hauteur de la cellule (14). Cette réduction cause la rupture des pôles du fuseau mitotique entraînant la formation de fuseau mitotique multipolaires (14). Finalement cette forme sphérique permet la répartition égale et aléatoire des différentes organelles, tel que le Golgi ou l'ER, entre les deux cellules filles (9).

D'un autre côté, l'arrondissement des cellules entraîne la perte de la polarité corticale. En effet, dans une cellule sphérique toutes les lignes droites qui passent par le centre géométrique de la cellule forment un équateur et pourraient couper « la sphère » en deux volumes identiques. Cependant, il est primordial que le sillon de clivage se positionne au bon équateur, sur l'axe défini par la plaque métaphasique. L'échec du positionnement du sillon de clivage à ce niveau est délétère pour la cellule. Ainsi, la polypléidie ou l'aneuploïdie causée par cet échec peut causer plusieurs maladies, dont le cancer (3, 11).

Afin d'assurer le bon positionnement de la cytokinèse, la cellule doit établir une polarité corticale, afin de signaler la localisation du sillon de clivage.

### **1.2.2. RhoA régulateurs clé de la cytokinèse**

Depuis les premières expériences réalisées par Rappaport en 1961, il est devenu clair que le fuseau mitotique joue un rôle clé dans la localisation du sillon de clivage (11, 17). Des expériences classiques de micromanipulation ont permis de démontrer une communication très dynamique entre le fuseau mitotique et le cortex cellulaire afin de déterminer le positionnement du sillon de clivage (18). En effet, déplacer le fuseau mitotique durant l'anaphase, entraîne la régression du sillon de clivage déjà formé et la formation d'un nouveau sillon de clivage au niveau du centre du fuseau mitotique (18, 19). De ce fait, les microtubules astraux et le central spindle, définissent la position de l'équateur cellulaire, entre les chromosomes ségrégués (20). Cette balise spatiale active la petite GTPase RhoA, le régulateur clé de la cytokinèse, au niveau du cortex équatorial (18, 21, 22). À ce niveau, RhoA permet l'assemblage de l'anneau d'acto-myosine dont la constriction permettra la séparation physique des deux cellules filles (11, 12, 20). Ce rôle central de RhoA a été démontré par

micromanipulation, en effet la zone où RhoA est active (liée à GTP) se déplace lorsque le fuseau mitotique est manipulé (18, 22).

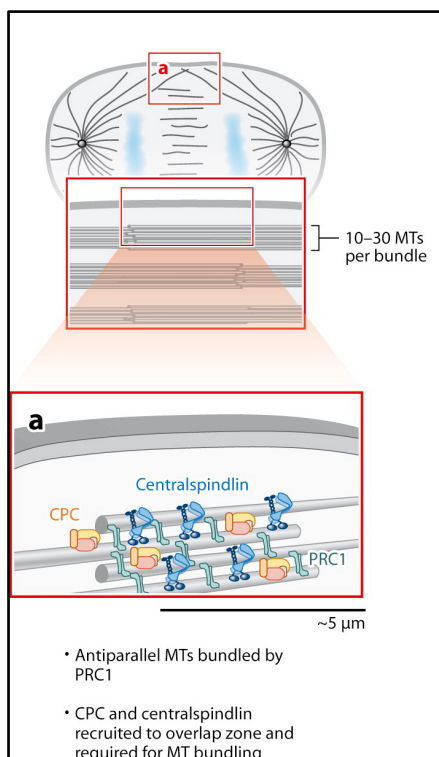
La famille des Rho GTPases est activée par les facteurs d'échange de la guanosine (GEF) qui permettent l'échange du Guanosine DiPhosphate (GDP) par du Guanosine TriPhosphate (GTP) (18). L'inactivation des Rho GTPases est, quant à elle, médiée par les protéines qui protègent les protéines activatrices de GTPases (GAP). Ces dernières stimulent l'activité GTPase intrinsèque des Rho GTPases afin d'hydrolyser le GTP en GDP et par conséquent inactiver les GTPases. (18, 23).

### 1.2.3. Le central spindle agit comme activateur de RhoA

À l'anaphase le central spindle est composé de microtubules antiparallèles et entremêlés (11). Plusieurs protéines, dont celles du cytosquelette, coopèrent pour organiser le central spindle (18). Parmi les acteurs importants du central spindle nous allons brièvement décrire les fonctions de : le centralspindline, le Chromosome Passenger Complex (CPC) et la Protein Required for Cytokinesis 1 (PRC1) (18, 20) (figure 1.3).

#### 1.2.3.1. La centralspindline

La centralspindline est un complexe tetrahétéromérique composé de deux molécules de la



GAP MgcRacGAP et deux molécules de la kinésine MKLP1 (11, 24-27). Avant l'anaphase une phosphorylation par CDK1 entraîne la séquestration de MKLP1 par la protéine 14-3-3 et empêche sa translocation à la zone centrale du central spindle (18, 28). À l'entrée de l'anaphase une phosphorylation de MKLP1 par le CPC sur un site adjacent à la phosphorylation par CDK1, entraîne sa libération (18). Ceci permet la polymérisation avec MgcRacGAP et la liaison aux microtubules et leurs translocations vers les extrémités positives de ces derniers (11, 29) vers la zone équatoriale du central spindle ou elle permet d'interconnecter les microtubules (11, 18, 28).

**Figure 1.3** : Les acteurs importants pour la formation du central spindle [adaptée de (18)]

La MgcRacGAP quant à elle, possède deux fonctions majeures, la première est le recrutement d'une GEF de RhoA Ect2 (18). Deuxièmement, MgcRacGAP régulerait la fonction de RhoA grâce à sa fonction GAP (18). Cependant, cette deuxième fonction est encore controversée (30)

#### **1.2.3.2. Le CPC :**

Le CPC est un complexe composé de quatre protéines : Aurora B, INCENP, la survivine et la Borealine (31). Brièvement, Aurora B est la kinase qui phosphoryle plusieurs substrats durant la cytokinèse. INCENP est une protéine du centromère qui sert d'échafaudage pour le complexe. La survivine permet la localisation du CPC au centromère. Finalement, la borealine est importante pour l'activation et l'interaction du CPC durant la cytokinèse (31). Le CPC joue plusieurs rôles importants de l'interphase à l'abscission, mais ici nous ne nous intéresserons qu'à sa fonction durant la cytokinèse (31). Durant l'anaphase, le CPC est important pour la formation du central spindle (20). En effet, le CPC est transloqué du centromère vers la zone équatoriale du central spindle où il recrute la centralspindline qui permettra par la suite l'activation de RhoA par Ect2 (18, 31). De plus, le CPC joue un rôle dans l'assemblage et le fonctionnement du sillon de clivage en phosphorylant les septines et en régulant indirectement la chaîne légère régulatrice de la myosine (MRLC) (20, 31). Aussi le CPC régule l'abscission des deux cellules filles en régulant les protéines ESCRT-III (11)

#### **1.2.3.3. Le PRC1**

PRC1 est un membre de la famille protéique MAP65, qui permet d'interconnecter (crosslink) les microtubules antiparallèles (18). Avant l'anaphase une phosphorylation par CDK1 empêche son homo-dimerisation et son activation (12, 18). En anaphase, l'homodimerisation de PRC1 lui permet de lier l'interface entre les microtubules antiparallèles et de faire le cross-link (20). De plus, PRC1 interagit avec une autre kinésine KIF4. Cette interaction permet le transport des deux protéines vers la zone équatoriale du central spindle (18), où, KIF4 a pour rôle de réguler négativement la croissance des microtubules (18). Cette fonction est importante pour déterminer la largeur de la zone d'activation de RhoA sur l'équateur cortical et la taille du sillon de clivage (18). En d'autres termes, la largeur de la zone de recrutement de la centralspindline et d'Ect2 sur le central spindle corrèle directement avec la zone d'activation de RhoA et celle du sillon de clivage à l'équateur de la cellule (18). De ce fait, la déplétion de KIF4 entraîne un sillon de clivage plus large (18). Par ailleurs, la déplétion de PRC1,

contrairement à celle de CPC ou de centranspindline, ne bloque pas l'assemblage ou la constriction du sillon de clivage chez *C. elegans* (18). Ceci suggère l'existence de redondance fonctionnelle avec d'autres crosslinkers des microtubules du central spindle (18).

La coopération de toutes ces protéines est importante pour la formation et le maintien du central spindle en anaphase (11, 12, 18, 20). Cette coopération est spatiotemporellement régulée pour permettre l'activation opportune de RhoA (18)

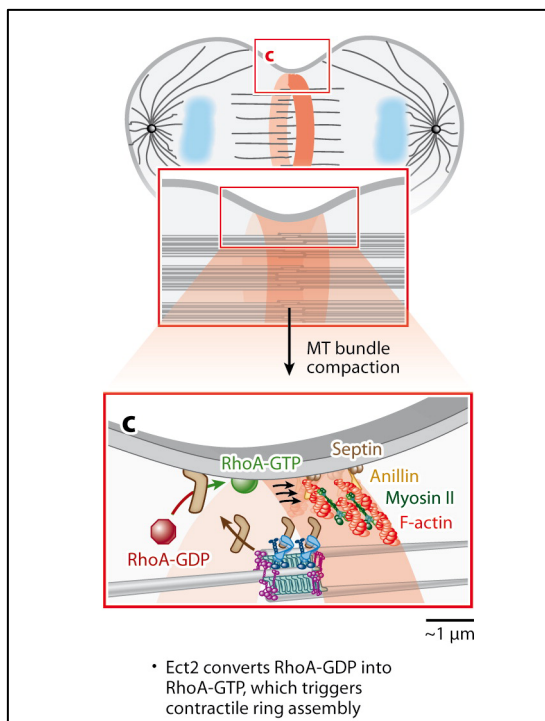
### 1.2.3.4. Activation de RhoA

#### 1.2.3.4.1. Ect2

La GEF Ect2 a été identifiée comme étant critique pour l'activation de RhoA durant la cytokinèse (18, 32). L'interaction d'Ect2 avec le centranspindline est nécessaire pour son transport le long du central spindle, sa translocation vers le cortex équatorial et l'initiation de la cascade de signalisation qui permet l'assemblage et la constriction du sillon de clivage (11). En métaphase, une phosphorylation par CDK1 empêche l'activation précoce de Ect2 (11). Dans les cellules humaines, Ect2 est recrutée au central spindle via une interaction avec le domaine amino-terminal de MgcRacGAP (11, 18, 20).

En effet, une phosphorylation de la partie amino-terminal de MgcRacGAP par la kinase PLK1

permet le recrutement de Ect2 sur la centralspindline (18, 33, 34). Une fois localisée sur le plan du futur sillon de clivage, Ect2 se déplace alors sur la membrane plasmique équatoriale adjacente (18). À ce niveau, Ect2 active RhoA (20).



**Figure 1.4 :** Activation de RhoA par la voie de signalisation du central spindle [adaptée de (18)]

Cependant chez la drosophile, l'orthologue d'ECT2 : Pebble (Pbl), ne semble pas partager le mécanisme exact de translocation du central

spindle vers la membrane plasmique (18, 35). Même si l'interaction entre Pbl et RacGAP50C (l'orthologue de MgcRacGAP chez la drosophile) est conservée, Pbl localise au niveau du cortex mais n'a pas été détectée sur le central spindle (18, 35, 36).

#### **1.2.3.4.2. L'activité GAP de MgcRacGAP**

Les petites GTPases cyclent entre l'état actif lié au GTP et l'état inactif lié au GDP grâce aux GEF et GAP respectivement (23). Il a été proposé que le domaine GAP de MgcRacGAP inactive RhoA durant la cytokinèse (20). Effectivement, il a été démontré que ce domaine est essentiel pour la cytokinèse dans plusieurs organismes (18, 37-39). De plus contrairement à RhoA, l'activation des autres membres de la famille des RhoGTPases Rac et Cdc42 ne sont pas requises pour la cytokinèse (12). Il a été d'abord suggéré que MgcRacGAP est potentiellement la GAP de RhoA durant la cytokinèse (12) mais ce rôle est encore très débattu (11, 18). En effet, l'activité GAP de MgcRacGAP est plus forte, *in vitro*, envers Rac et Cdc42 qu'envers RhoA (12). De plus, la mutation de Rac (mais pas celle de RhoA) sauve le phénotype de la déplétion de MgcRacGAP (18, 38, 40). Ceci suggère une interaction génétique entre MgcRacGAP et Rac (40). De ce fait, il a été proposé que MgcRacGAP inhibe Rac et posséderait même un rôle, contre-intuitif, d'activateur de RhoA (11, 18, 38-40). L'inactivation de Rac durant la cytokinèse permettrait d'inhiber la fonction du nucléateur d'actine Arp2/3 et empêcherait la formation d'un réseau d'actine branchée (11, 18, 20, 38). Ceci permettrait de réduire la tension corticale au niveau de l'équateur car la nucléation d'actine non branchée permet l'ingression rapide et robuste du sillon de clivage (11).

Il a été alors proposé que p190RhoGAP, qui colocalise avec RhoA au sillon de clivage, agirait comme la GAP de RhoA (41, 42). De plus, un crible de 67 RhoGap a identifié MP-GAP comme importante pour l'activité de Rho durant la cytokinèse (41, 43). Ce qui permet de positionner ces deux GAP comme, potentiellement, les deux régulateurs négatifs de RhoA.

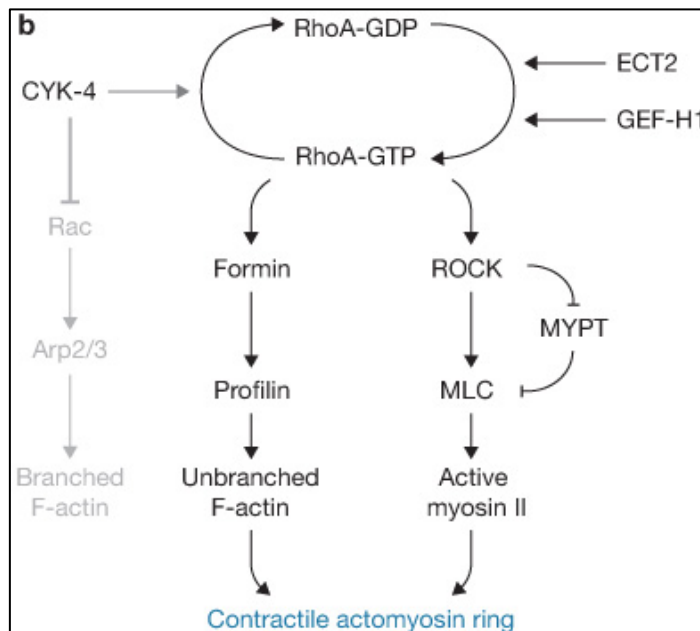
#### **1.2.4. Fonctions de RhoA dans l'assemblage du sillon de clivage**

RhoA activée stimule deux voies de signalisation qui vont permettre la formation du sillon de clivage (11, 20). D'un côté, RhoA stimule la nucléation d'actine non branchée en activant la formine Diaphanous (20, 44). D'un autre côté, RhoA active ROCK, en le liant et en empêchant son autoinhibition (45). ROCK active la myosine II en phosphorylant la MRLC



(20). Parallèlement, ROCK inactive MYPT la phosphatase qui dephosphoryle la myosine (20) (voir figure 1.5).

Au niveau du sillon de clivage est recrutée une protéine d'échafaudage : l'anilline (46-49). Cette protéine est importante pour la formation du sillon de clivage, car elle permet de faire le cross-link entre la membrane plasmique et la machinerie de cytokinèse (11, 50). D'un côté, l'anilline joue le rôle d'une plateforme organisatrice pour la machinerie de cytokinèse en liant plusieurs de ses membres, dont l'actine, la myosine, RhoA, Ect2 et MgcRacGAP (11, 50). D'un autre côté, elle permet l'ancrage du sillon de clivage à la membrane plasmique en se liant à un phospholipide important de cette dernière, le phosphatidylinositol 4,5 Biphosphates (PI(4,5)P2) (51).



**Figure 1.5 :** Rôles de RhoA dans la constriction du sillon de clivage [adaptée de (20)]

Bien que la déplétion de l'anilline déstabilise le sillon de clivage et cause l'échec de la division cellulaire, elle ne compromet pas l'ingression du sillon de clivage (11, 46, 47). Ceci suggère une redondance dans le recrutement de la machinerie de cytokinèse au niveau

du sillon de clivage.

Suite à l'assemblage du sillon de clivage, la contraction de l'anneau d'acto-myosine permet l'ingression de la membrane plasmique attachée à ce dernier (20). Ceci permet de séparer la cellule mère en deux cellules filles (20). Cependant, le mécanisme générateur de la force de constriction n'est pas encore tout à fait clair et il est encore sujet à débat (20). Brièvement, le modèle classique propose que des filaments bipolaires de myosine se déplacent le long des filaments d'actine et permettent de générer une force de contraction similaire à celle produite par les sarcomères musculaires (20). Mais ce modèle nécessite l'alignement des fibres d'actine

avec la myosine II sur l'axe du sillon du clivage (20). Or, il a été démontré que les fibres d'actine, au niveau du sillon de clivage, pouvaient être orientées vers des directions autres que celles de l'axe d'ingression (20, 52). De plus, la déplétion de la myosine II, qui empêche la formation du sillon de clivage, a été sauvée par la surexpression d'une forme de myosine II mutante qui est capable de maintenir la tension; mais qui est incapable de se déplacer le long des fibres d'actine (18, 53). Ceci suggère que le rôle de la myosine II se limite à interconnecter les différentes fibres d'actine (18).

#### 1.2.5. **Abscission :**

Le sillon de clivage continue sa constriction jusqu'à ce que l'anneau d'acto-myosine atteigne un diamètre d'approximativement un micromètre (18). Durant ce processus, le central spindle est remodelé pour former un réseau dense de microtubules antiparallèles (18) afin de former le pont intercellulaire (20). Dans la majorité des cellules animales, ce pont permet de relier les deux cellules filles pendant quelques heures après la télophase (20). La machinerie de cytokinèse accumulée au centre du pont intercellulaire forme le midbody (11). Ce dernier consiste en un manchon composé entre autres du reste de la machinerie de la cytokinèse entourant un dense amas de microtubules antiparallèles. Certains membres de la machinerie de cytokinèse, tels que l'anilline et la centralspindline se localisent au midbody et y demeurent jusqu'après l'abscission (11). À cette étape, une des deux cellules filles phagocyte le reste du midbody et le dégrade par autophagie (51). Par contre, d'autres membres de la machinerie de cytokinèse, tels que l'actine, doivent être dégradés rapidement après la formation du midbody (11, 51). L'accumulation ectopique d'actine au niveau du pont intercellulaire peut entraver le processus d'abscission (54). Une fois formé, le midbody sert de plateforme pour le ciblage de la machinerie d'abscission ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) qui va catalyser la fission membranaire et la séparation finale des deux cellules filles (11)

#### 1.2.6. **Rôle des microtubules dans le positionnement de l'axe de division**

La cytokinèse est un processus essentiel pour la séparation des deux cellules filles (3, 11, 18, 55). Ce processus très dynamique nécessite une régulation spatiotemporelle très précise afin de permettre la séparation des deux cellules filles au bon endroit et au bon moment. D'un point de vue temporel, le point de contrôle (checkpoint) de la complétion de l'assemblage du

fuseau mitotique, médié par l'APC, permet une régulation précise du déclenchement de l'anaphase (18). D'un point de vue spatial, l'arrondissement des cellules en métaphase peut être problématique pour le recrutement de la machinerie de cytokinèse sur l'équateur de la plaque métaphasique. Plusieurs mécanismes pourraient servir de repère pour la machinerie de cytokinèse en leur indiquant la position de l'équateur. Premièrement, le modèle de la relaxation astrale : Ce modèle propose que les microtubules astraux émettent, au niveau des pôles cellulaires, des signaux qui inhibent la formation du sillon de clivage (11, 18, 20). En effet, des expériences génétiques ou de micromanipulation ont montré que le positionnement de microtubules astraux d'un côté d'une cellule entraîne la formation d'un flux cortical d'actine vers le côté opposé de la cellule (56). Aussi, il a été démontré que le réseau dense de microtubules astraux régule négativement la myosine au cortex polaire (12, 18, 57). L'inhibition de la contractilité par les microtubules astraux au niveau des pôles, crée un gradient de contraction qui est orienté des pôles vers l'équateur et qui permet la mise en place du sillon de clivage(18). Deuxièmement, le modèle de la stimulation par le central spindle et les microtubules astraux équatoriaux : En plus du rôle du central spindle dans l'activation de RhoA, décrit ci-dessus, ce modèle propose que des microtubules astraux stabilisés en contact avec la zone équatoriale délivrent un signal positif pour la formation du sillon de clivage (11, 12, 18, 20). En effet, en plus du central spindle, la centralspindle lie Ect2 et peut être transportée vers l'extrémité positive des microtubules astraux associés à l'équateur cellulaire (58). Une fois arrivé au cortex, ce complexe active RhoA et fournit un repère spatial pour la localisation du sillon de clivage (11, 18, 20).

Bien évidemment, ces différents modèles sur le positionnement du sillon de clivage ne sont pas mutuellement exclusifs (11, 12, 18, 20). En fait, une collaboration entre toutes ces méthodes pour bien localiser le sillon de clivage est très probable. La redondance fonctionnelle pour situer le sillon de clivage est un avantage certain pour les cellules leur permettant d'avoir des mécanismes de compensation dans le cas de perte du processus principal pour la localisation du sillon de clivage.

### **1.2.7. Quel est le rôle du PI(4,5)P2 dans la localisation du sillon de clivage?**

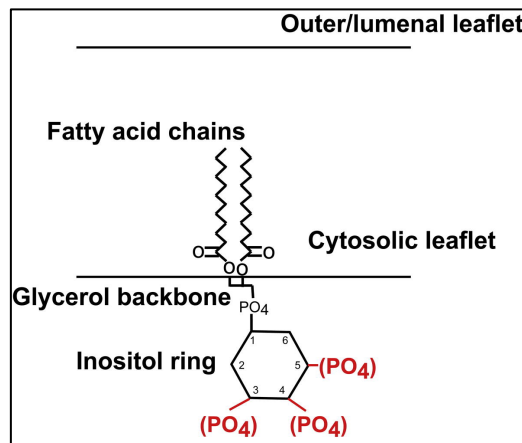
En plus du positionnement spatial de la machinerie de cytokinèse médié par les protéines décrites ci-dessus, dès 2005 plusieurs évidences ont révélé le rôle émergent du

PhosphoInositide PI(4,5)P<sub>2</sub> dans la localisation spatiale et le bon fonctionnement du sillon de clivage (12, 51, 59-62).

Dans la section suivante, nous allons introduire les phosphoinositides en général. Par la suite, nous allons nous concentrer sur les différents rôles du PI(4,5)P<sub>2</sub> durant la division. Pour finir la section d'introduction, nous allons nous intéresser à certaines enzymes importantes pour la régulation du niveau du PI(4,5)P<sub>2</sub> durant la cytotinèse.

### 1.3. Phosphoinositides

Le Phosphatidylinositol (PI) est un phospholipide qui est un membre important de la membrane plasmique (51, 62-68). Il est formé d'une queue composée de deux acides gras hydrophobes qui sont liés à une molécule de glycérol (68). Cette dernière est reliée, via un acide phosphorique à un groupement myo-Inositol hydrophile (figure 1.6) (68).



**Figure 1.6 :** Structure chimique des PIPs [source (66)].

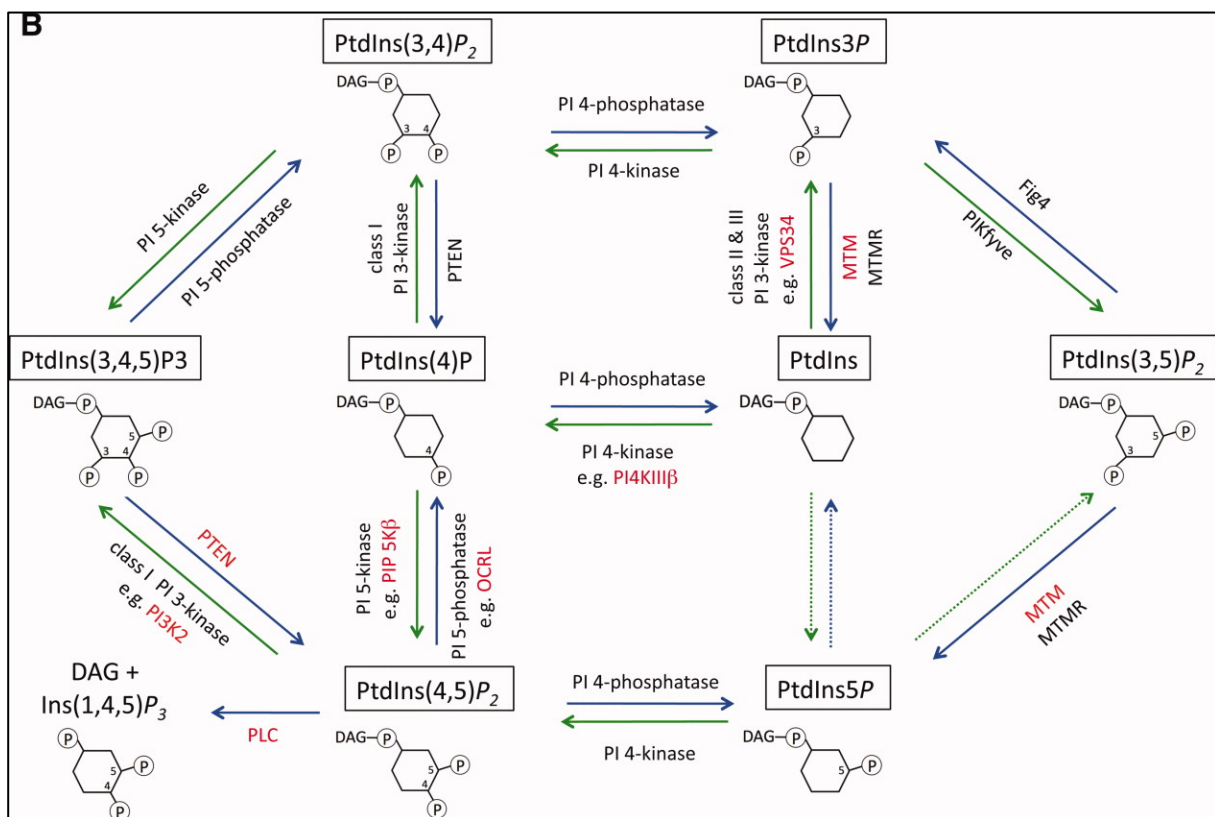
Ce groupement Inositol peut être phosphorylé ou déphosphorylé, de façon réversible, à la position D3, D4 et/ou D5 et produit 7 types différents de Phosphatidylinositols Phosphates (PIP) : dont 3 PIP monophosphorylés : le Phosphatidylinositol 3-Phosphate (**PI(3)P**), le Phosphatidylinositol 4-Phosphate (**PI(4)P**) et Phosphatidylinositol 5-Phosphate (**PI(5)P**). 3 PIP biphosphorylés : le Phosphatidylinositol 3,4 biPhosphates (**PI(3,4)P2**), le Phosphatidylinositol 3,5 biPhosphates (**PI(3,5)P2**) et le Phosphatidylinositol 4,5 biPhosphates (**PI(4,5)P2**). Finalement Un PIP triphosphorylé : le Phosphatidylinositol 3,4,5 triPhosphates (**PI(3,4,5)P2**) (51).

Les PI et PIP (PIPs) se localisent exclusivement aux membranes cellulaires (62). Au niveau de ces dernières, la queue hydrophobe est ancrée dans la face cytosolique de la bicouche lipidique (62). Alors que le groupement Inositol hydrophile est exposé au cytosol et permet le recrutement dynamique des protéines cibles (62). Ces interactions permettent au PIPs de jouer un rôle très important dans plusieurs voies de signalisations (62, 68). Historiquement, les PIPs étaient connus comme précurseurs de seconds messagers dans la transduction du signal cellulaire provenant des récepteurs de surfaces (68). En effet, activées par les GPCR ou les RTK, les phospholipases C (PLC) hydrolysent le PI(4,5)P2 et produisent deux seconds messagers (68). D'un côté, l'Inositol triPhosphates (IP3) se lie aux récepteurs de l'IP3 au

niveau du ER et permet l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium libre qui est nécessaire pour un nombre important de processus cellulaires (69). D'un autre côté, l'hydrolyse du PI(4,5)P<sub>2</sub> produit le DiAcylGlycérol (DAG) qui permet l'activation de la Protéine Kinase C (PKC) qui phosphoryle plusieurs protéines cibles dans plusieurs voies de signalisation (62, 68)

Bien que les PIPs ne représentent que 1% des lipides cellulaires totaux, il a été démontré qu'ils sont impliqués dans une panoplie de processus cellulaires fondamentaux tels que : la transduction du signal, le trafic membranaire, le remodelage du cytosquelette et la survie cellulaire (62-64, 68, 70).

Les PIPs sont métaboliquement interconnectés (figure 1.7) (62). Chez les mammifères plus d'une soixantaine d'enzymes régulent la production et la dégradation des différents types de PIPs (68)



**Figure 1.7 :** Métabolismes des PIPs [adaptée de (62)]

La localisation de ces enzymes dans différents compartiments cellulaires permet la régulation spatio-temporelle des niveaux de PIPs (62). Ceci explique le fait que certaines enzymes qui

catalysent les mêmes réactions biochimiques ne sont pas redondantes fonctionnellement (68). En effet, des isoformes multiples de kinases, phosphatases et PLC permettent de réguler les PIPs dans des compartiments cellulaires préférentiels (62, 68). Conséquemment, les membranes internes (endomembranes) de ces compartiments cellulaires vont contenir un type de PIP majoritaire. Par exemple : le Golgi est riche en PI(4)P. Le PI(3)P est souvent associé avec les endosomes précoces et les autophagosomes (51, 62, 64, 68). Alors que le PI(4,5)P<sub>2</sub> est majoritairement associé avec la membrane plasmique (MP) (51, 62, 64, 68). Cette association des PIPs avec différents compartiments cellulaires peut alors servir d'un potentiel **code d'identification** pour ces compartiments (62). Effectivement, les PIPs peuvent réguler les fonctions cellulaires en recrutant de façon réversible des protéines au niveau des endomembranes spécifiques ou de la MP (62). Certaines de ces protéines possèdent des domaines de liaisons spécifiques à un ou plusieurs PIPs : tels que les domaines Pleckstrin Homology (PH), FYVE ou FERM (Tableau 1) (68)

Table 1. Inositide binding domains	
Name of Domain	Lipid Species
Pleckstrin homology (PH) domains	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>
	PtdIns4P
	PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>
	PtdIns(3,4)P <sub>2</sub>
FYVE domains (named after the four proteins in which they were first identified: Fab1, YOTB/ZK632, Vac1p, and EEA1)	PtdIns3P
Phox homology (PX) domains	PtdIns3P
ENTH (epsin NH <sub>2</sub> -terminal homology)	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>
ANTH (AP180 NH <sub>2</sub> -terminal homology)	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>
FERM domains (named after the first proteins in which they were found: 4.1-ezrin-radixin-moesin)	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>
PTB domain	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>
GLUE domain	PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>
Eps15 homology (EHD) domains	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> , PtdIns4P
BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs)	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> , other lipids
PDZ domain	PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>

**Tableau 1 :**  
Domaines de liaisons  
au PIPs [adaptée de  
(68)].

Une régulation précise de l'identité membranaire et le recrutement opportun des protéines permet aux PIPs d'orchestrer des processus cellulaires dynamiques et hautement régulés tels que le trafic vésiculaire ou la cytokinèse (62, 67, 68, 70). La perte de l'homéostasie des PIPs entraîne, de ce fait, une accumulation ectopique des protéines qui les lient et la perturbation de ces processus cellulaires (54, 64, 66, 70). Par conséquent, des mutations des enzymes régulant le métabolisme des PIPs sont directement la cause de plusieurs maladies telles que des cancers (mutations de PTEN), ou maladies génétiques comme le syndrome de Lowe (51, 62, 68). De

plus, il a été démontré que la perte de l'homéostasie du PI(4,5)P<sub>2</sub> (notre PIP d'intérêt) entraîne la perturbation de la cytotinèse (59, 60) et peut conduire à la formation de cancers (3).



### **1.3.1. PI(4,5)P2**

Le PI(4,5)P2 est un des PIPs des plus abondants dans la cellule et il est aussi le PIP le plus abondant de la membrane plasmique (51, 62, 68). Le PI(4,5)P2 au niveau de la MP joue un rôle important dans plusieurs processus cellulaires tels que l'exocytose, l'endocytose, la polarisation cellulaire et la morphogenèse (68). Dans le cadre de ces travaux nous allons nous intéresser majoritairement aux rôles du PI(4,5)P2 durant la cytokinèse.

En effet, un équilibre précis entre la production du PI(4,5)P2 au début de l'anaphase et la dégradation de ce dernier après la formation du pont intercellulaire est requis pour le bon déroulement de la cytokinèse (51, 54, 59, 60, 62). Le PI(4,5)P2 est l'un des PIPs les plus enrichis au niveau de l'équateur cellulaire en anaphase (59-62). La source principale du PI(4,5)P2, à ce niveau, est la phosphorylation à la position D5 du PI(4)P par la PI(4)P-5Kinase (Skittles (Sktl) chez la drosophile) (51, 60, 61). En plus de l'enrichissement de Sktl au niveau du sillon de clivage, dans le laboratoire nous avons montré que la 3-Phosphatase PTEN est aussi enrichie au niveau de l'équateur cortical entre l'anaphase et la formation du pont intracellulaire (51, 61). Cette phosphatase contribuerait à la production d'un bassin minoritaire de PI(4,5)P2 provenant de la déphosphorylation du PI(3,4,5)P3 à la position D3 (51, 61).

L'enrichissement de PI(4,5)P2 est important pour la cytokinèse (51). Il a été montré que la perturbation du niveau ou de la disponibilité du PI(4,5)P2 au sillon de clivage bloque la cytokinèse et provoque la binucléation cellulaire (51, 59, 60). La contribution importante du PI(4,5)P2 durant la cytokinèse passerait par deux fonctions majeures de ce PIP durant ce processus : le recrutement de la machinerie de cytokinèses au sillon de clivage et le remodelage du cytosquelette d'actine.

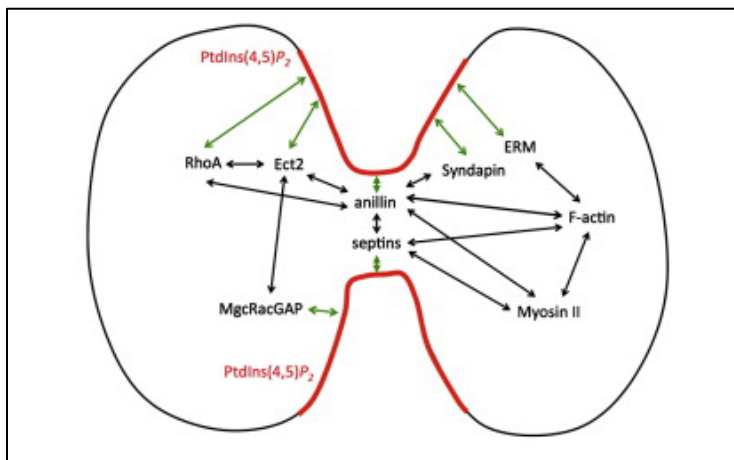
#### **1.3.1.1. Le recrutement de la machinerie de cytokinèse**

Le rôle critique du PI(4,5)P2 durant la cytokinèse peut s'expliquer par le fait que plusieurs protéines, qui sont des membres importants de la machinerie de cytokinèse, interagissent directement avec le PI(4,5)P2 (figure 1.8) (51, 62). Parmi ces membres :

##### **1.3.1.1.1. RhoA**

Il a été démontré que RhoA lie directement certains PIPs tels que le PI(4,5)P2 et le PI(3,4,5)P3 (71, 72). La surexpression de la 5-phosphatase Synaptojanine, dans les cellules HeLa, entraîne la baisse du niveau du PI(4,5)P2 et celui de RhoA au sillon de clivage (62, 73). Le recrutement de RhoA à l'équateur est médié par une queue polybasique carboxy-terminale qui peut

directement lier plusieurs PIPs (62, 71). La liaison directe de RhoA au PI(4,5)P2 pourrait représenter un mécanisme de secours qui agit en parallèle au recrutement de RhoA, au sillon de clivage, par Ect2 ou l'anilline (62)



**Figure 1.8 :** Les liaisons directes entre le PI(4,5)P2 et la machinerie de cytocinèse (MDC). La couleur rouge indique la position du PI(4,5)P2. Les flèches noires indiquent les interactions directes entre les protéines de la MDC. Les flèches vertes indiquent les interactions directes entre le

PI(4,5)P2 et la MDC [adaptée de (51)].

### 1.3.1.1.2. Ect2

Ect2 lie la centralspindle pour être localisée à la zone centrale du fuseau mitotique en anaphase A (18). Par la suite, une fraction d'Ect2 se localise au niveau du cortex équatorial pour activer RhoA (18, 62). Ect2 possède un domaine PH et une séquence polybasique qui lui permettent de lier le PI(4,5)P2 et le PI(3,4,5)P3 (62, 72, 74). Il a été montré qu'une mutation ponctuelle sur ce domaine PH empêche la liaison au PIP bloquant ainsi la localisation corticale d'Ect2 (62, 72). De plus, il a été démontré que l'enrichissement du PI(4,5)P2 ne permet pas à lui tout seul le recrutement d'Ect2 qui a besoin d'une interaction préalable avec le complexe Centralspindle (62, 74). Ces données indiquent que la liaison au PI(4,5)P2 est nécessaire, mais pas suffisante pour la localisation d'Ect2 au sillon de clivage. Il est intéressant de noter que le domaine PH d'Ect2 interagit aussi avec l'anilline qui se lie elle aussi au PI(4,5)P2 (62, 72). Cette redondance démontre les multiples mécanismes, par lesquels, le PI(4,5)P2 recruterait la machinerie de cytocinèse au sillon de clivage.

### 1.3.1.1.3. Anilline

L'anilline est une protéine clé de la machinerie de cytocinèse (47, 50, 75). Avec sa capacité d'interagir avec de multiples composantes de la machinerie de cytocinèse (telles que RhoA, Ect2, MgcRacGAP, l'actine filamenteuse, la myosine II, les septines et les microtubules) elle

joue le rôle de protéine d'échafaudage régulant la formation et la stabilité du sillon de clivage (75). L'anilline possède un domaine PH qui permet de lier différents PIP dont le PI(3,4,5)P3 et le PI(4,5)P2 (72). Cependant, uniquement la réduction de la quantité du PI(4,5)P2 affecte négativement la localisation de l'anilline au sillon de clivage (62, 76). En liant le PI(4,5)P2 d'un côté et différents membres de la machinerie de cytokinèse de l'autre, l'anilline joue le rôle d'interconnecteur (crosslinker) (62, 75). De ce fait, elle permettrait le transfert de la force générée par l'anneau d'acto-myosine vers la membrane plasmique et participerait à la séparation physique des deux cellules filles (62, 75). Même si ce rôle est important, il ne semble pas unique à l'anilline. En effet, la déplétion de l'anilline dans les cellules S2 de drosophiles déstabilise le sillon de clivage et cause l'échec de la majorité des divisions cellulaires (48). Cependant, une large population de ces cellules démontrent une régression tardive (au moment de la formation du pont intercellulaire) du sillon de clivage (48). Ceci indique que la force de constriction de l'anneau d'actomyosine est transmise à la membrane plasmique même en absence de l'anilline (62). Ceci suggère l'existence d'une redondance fonctionnelle pour interconnecter l'anneau d'actomyosine à la membrane plasmique (62). Les candidats idéaux pour cette redondance sont les protéines de la famille ERM (62)

#### **1.3.1.1.4. Les ERM**

Les protéines de la famille Ezrine, Radixine et Moesine (ERM) sont des membres de la machinerie de cytokinèse (61, 77-79). Les ERM se localisent au niveau du sillon de clivage en anaphase (61, 77, 78) grâce à leur domaine FERM qui leur permet de lier le PI(4,5)P2 (61, 62, 77-79). Des travaux menés dans le laboratoire, ont permis de démontrer que la dMoesine (unique membre des ERM chez la drosophile) est activée par phosphorylation par la kinase Slik (SLK chez les mammifères) et la liaison au PI(4,5)P2 (61, 78). Une dégradation du PI(4,5)P2 au sillon de clivage entraîne la délocalisation de la dMoesine du cortex vers le cytoplasme (61). Activée, la dMoesine interconnecte l'anneau d'actomyosine et les microtubules à la membrane plasmique (61, 77). Nos recherches ont déterminé que cette fonction est importante pour la stabilité corticale et l'orientation du fuseau mitotique durant la mitose (61, 77, 78). Cependant la déplétion de la dMoesine ne présente pas de défauts importants de binucléations cellulaires (61, 77, 78). Ceci indiquerait une potentielle redondance fonctionnelle, possiblement avec l'anilline, pour interconnecter l'anneau d'actomyosine avec la membrane plasmique (62).

#### **1.3.1.1.5. MgcRacGAP**

Cette protéine membre du complexe centralspindle lie le PI(4)P et le PI(4,5)P2 grâce à un domaine C1 atypique (51, 80). La perte de cette liaison par mutation ponctuelle au niveau du C1 entraîne des défauts de cytokinèse (51)

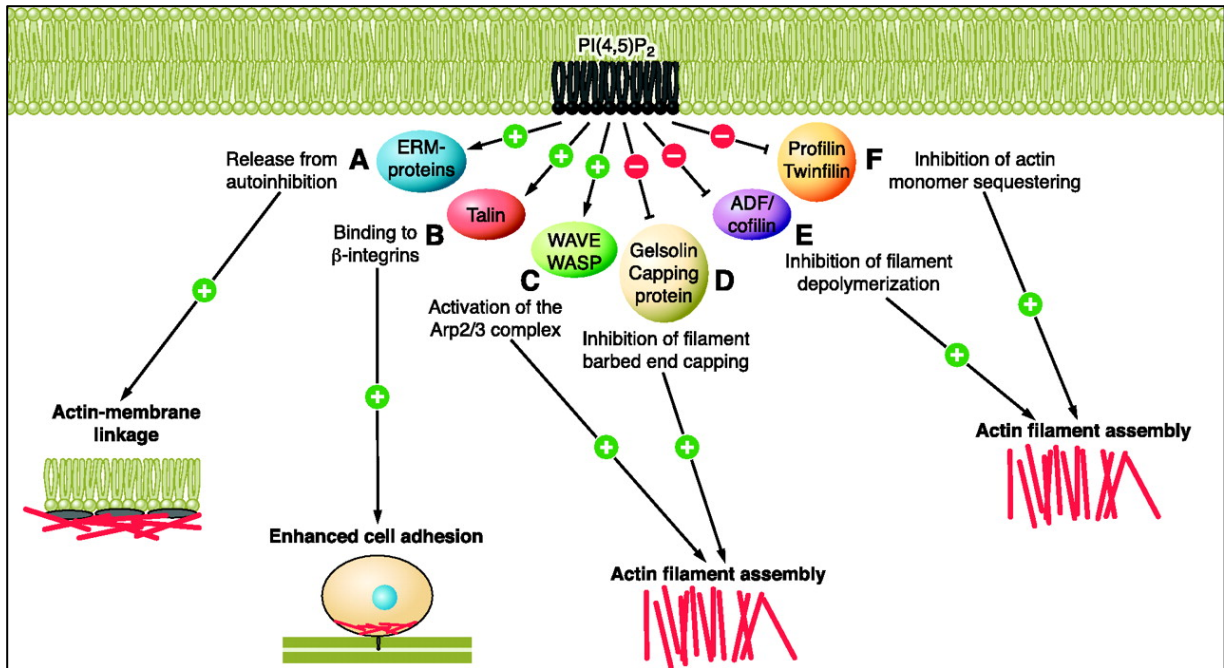
Plusieurs membres de la machinerie de cytokinèse interagissent entre eux et avec le PI(4,5)P2. Ces interactions sont essentielles pour le positionnement et le fonctionnement du sillon de clivage. Ce grand nombre d'interacteurs, font du PI(4,5)P2 un facteur central dans la localisation et le fonctionnement du sillon de clivage.

#### **1.3.1.2. Régulation du cytosquelette l'actine**

Au sillon de clivage, la deuxième fonction importante du PI(4,5)P2 est la régulation du cytosquelette d'actine (81). Ce dernier, est une structure dynamique qui joue un rôle fondamental dans divers processus cellulaires tels que la cytokinèse, la migration ou l'endocytose (81). En effet chacun de ces processus nécessite un remodelage dynamique de la membrane plasmique dépendant de l'actine (81). La structure et la dynamique du cytosquelette d'actine sont régulées par de nombreuses protéines qui se lient à l'actine (81, 82). Parmi ces protéines on retrouve : les protéines favorables à la nucléation de l'actine telle que le complexe Arp2/3 (actine branchée) ou les formines (actine non branchée) (81). On retrouve aussi les protéines qui permettent la fragmentation et la dépolymerisation de l'actine, telle que ADF/Cofiline ou la Gelsoline (81). D'autres protéines régulent le cytosquelette d'actine en interagissant avec les monomères d'actine (tel que Profiline) ou l'extrémité barbue des filaments d'actines (tel que les protéines de coiffage) (81).

L'activité de ces protéines liant l'actine est contrôlée par plusieurs voies de signalisation afin d'assurer une régulation spatiotemporelle de la dynamique de l'actine (81). Un des régulateurs les plus caractérisés des protéines qui se lie à l'actine est la famille des Rho-GTPases (81). En effet, chez les mammifères, RhoA par exemple induit la formation des fibres de stress contractiles ou de l'anneau d'actomyosine en cytokinèse (18, 81).

Le PI(4,5)P2 régulent le cytosquelette d'actine à plusieurs niveaux (figure 1.9) (81, 82).



**Figure 1.9 :** Régulation de l'actine par le PI(4,5)P<sub>2</sub>. Une augmentation locale de la concentration de PI(4,5)P<sub>2</sub> peut affecter de plusieurs façons le cytosquelette d'actine [Source (81) ].

Premièrement, comme mentionné précédemment, le PI(4,5)P<sub>2</sub> régule le recrutement et l'activité de RhoA (62, 82). Deuxièmement, le PI(4,5)P<sub>2</sub> recrute des protéines telles que l'anilline et les ERM qui permettent d'interconnecter le cytosquelette d'actine et la membrane plasmique au cours de la cytokinèse (18, 61, 62, 82). Finalement, le PI(4,5)P<sub>2</sub> s'associe directement aux protéines qui se lient à l'actine et régule leurs interactions avec cette dernière (81, 82). Le PI(4,5)P<sub>2</sub> régule, directement ou indirectement, au moins une douzaine de ces protéines qui se lient à l'actine (81). Généralement, le PI(4,5)P<sub>2</sub> active les protéines qui régulent positivement le cytosquelette d'actine et inhibe la dépolymérisation de l'actine (81, 83). Comme résultats le PI(4,5)P<sub>2</sub> transmet un signal qui est majoritairement favorable vers une polymérisation de l'actine. Parmi ces protéines nous pouvons mentionner quelques exemples :

#### 1.3.1.2.1. Arp2/3

La croissance d'un filament d'actine commence par la formation d'un noyau d'actine (81, 82). Ce processus est grandement accéléré par les protéines de nucléation de l'actine. Parmi ces

nucléateurs, Arp2/3 permet la nucléation de l'actine en s'attachant sur le côté d'un filament préexistant (81, 84, 85). Ce qui permet de former un réseau d'actine branchée avec un angle constant de 70 degrés entre le filament mère et le nouveau filament (85). Les principaux régulateurs d'Arp2/3 sont la famille de protéines WASP (tels que N-WASP) (81). Ces protéines lient le PI(4,5)P2 qui permet, en collaboration avec Cdc42 dans certains cas, de bloquer leur autoinhibition (81, 84). Ainsi, une augmentation de la concentration du PI(4,5)P2 permet d'activer la polymérisation de l'actine par Arp2/3 (81).

#### **1.3.1.2.2. ADF/Cofiline**

La Cofiline est une protéine présente chez tous les eucaryotes (81, 86). Elle s'associe à l'actine monomérique et filamenteuse avec une préférence pour l'actine liée à l'ADP (81). La Cofiline déstabilise le cytosquelette d'actines en favorisant sa dépolymérisation et sa fragmentation (86). La Cofiline se lie à plusieurs PIP dont le PI(4,5)P2 et le PI(3,4,5)P3 (81, 86). La liaison au PI(4,5)P2, séquestre la Cofiline et empêche donc la dépolymérisation des filaments d'actine (81, 86, 87)

#### **1.3.1.2.3. Gelsoline**

La super famille des Gelsoline présente une forte activité de fragmentation des filaments d'actine et de coiffage des extrémités barbues de ces derniers (81). Cette fonction est régulée par le calcium et la liaison au PI(4,5)P2 (83). En effet, le calcium augmente l'affinité de la Gelsoline envers le PI(4,5)P2 (81, 83). Cette liaison inhibe l'interaction de la Gelsoline avec l'actine filamenteuse et sa fonction déstabilisatrice du cytosquelette d'actine (81).

Autant pour le recrutement de la machinerie de cytokinèse que pour la régulation positive du cytosquelette d'actine, le PI(4,5)P2 joue un rôle central durant la cytokinèse. Le PI(4,5)P2 régule, directement ou indirectement, un nombre important de protéines impliquées dans ces deux processus. Ceci suggère que le PI(4,5)P2 servirait de repère spatial pour la localisation de la machinerie de cytokinèse.

### **1.3.2. Le métabolisme du PI(4,5)P2**

Plusieurs enzymes, impliquées dans le métabolisme des PIPs, produisent le PI(4,5)P2 (figure 1.7) (88). La voie de synthèse majoritaire est contrôlée par la PI(4)P-5Kinase (Skittles chez la drosophile) (88). Alternativement, le PI(4,5)P2 est produit par la phosphorylation à la position

D4 du PI(5)P par la PI(5)P-4Kinase (68). Cependant, le PI(5)P étant plus rare que le PI(4)P, cette voie ne produit qu'une quantité mineure de PI(4,5)P<sub>2</sub> (88). Finalement, le PI(4,5)P<sub>2</sub> peut être produit par la déphosphorylation à la position D3 du PI(3,4,5)P<sub>3</sub> par la 3-phosphatase PTEN (88). Le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> est majoritairement produit par la PI-3Kinase à partir du PI(4,5)P<sub>2</sub> et il ne représente qu'une fraction minoritaire (2 à 5%) de ce dernier (88). De ce fait, le rôle de cette voie est d'avantage dédié à réduire le niveau de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> qu'à produire du PI(4,5)P<sub>2</sub> (88). Parallèlement, quatre voies métaboliques réduisent la concentration du PI(4,5)P<sub>2</sub>. Premièrement, les PI-5phosphatase déphosphorylent le PI(4,5)P<sub>2</sub> à la position D5 pour produire du PI(4)P (68). Chez les mammifères, il existe 10 PI-5Phosphatases qui peuvent déphosphoryler le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, PI(4,5)P<sub>2</sub>, le PI(3,5)P<sub>2</sub> et/ou le PI(5)P (68). Parmi ces PI-5phosphatases, au moins six enzymes régulent négativement le niveau de PI(4,5)P<sub>2</sub> : SYNJ1, SYNJ2, OCRL1, INPP5B, INPP5E et INPP5F (68). Deuxièmement, les PI-4Phosphatases déphosphorylent le PI(4,5)P<sub>2</sub> à la position D4 pour produire du PI(5)P (68). Troisièmement, les PI-3Kinases induisent la phosphorylation du PI(4,5)P<sub>2</sub> sur la position D3 pour produire du PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (68). Le PI(4,5)P<sub>2</sub> est l'un des PIPs les plus abondants dans la cellule, alors que le PI(5)P et le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sont plus rares. Ceci suggère que ces deux voies de réduction du PI(4,5)P<sub>2</sub> n'ont que des rôles minoritaires sur la concentration finale de ce PIP (68). Finalement, le PI(4,5)P<sub>2</sub> peut être hydrolysé en IP<sub>3</sub> et DAG par les PLC (68).

Dans le cadre de nos travaux nous allons nous intéresser plus particulièrement à trois de ces protéines régulant le niveau du PI(4,5)P<sub>2</sub> : les Phospholipases C, PTEN et OCRL1 une PI-5Phosphatase.

### 1.3.2.1. PLC

La fonction principale des phospholipases C (PLC) est l'hydrolyse préférentielle du PI(4,5)P<sub>2</sub> et la production de deux seconds messagers que sont les DAG et l'IP<sub>3</sub> (51, 89-91). Cette réaction régule de nombreux processus cellulaires, directement et indirectement (90). En effet, le DAG active, de façon calcium dépendante, les protéines Kinase C (PKC) (89-92). Ces dernières phosphorylent des effecteurs qui régulent positivement plusieurs fonctions cellulaires dont la prolifération, la polarité, la transcription, le métabolisme ou encore la réponse immunitaire (6, 89). L'IP<sub>3</sub>, quant à lui, est une molécule soluble qui diffuse de la membrane plasmique vers le cytosol (6, 89-91). Au niveau du RE, l'IP<sub>3</sub> se lie à son récepteur,

qui agit comme un canal calcique dépendant de l'IP<sub>3</sub>, et permet le relargage du calcium des citernes calciques (89-91). L'augmentation de la concentration de calcium est au centre d'un réseau majeur de régulation des processus cellulaires important pour la prolifération, la différenciation, la fertilisation, la croissance et la division cellulaire (6, 89-91). Finalement en régulant négativement la concentration de PI(4,5)P<sub>2</sub>, les PLC participent au maintien de l'homéostasie des PIP. Cela permet une régulation spatiotemporelle des processus cellulaires pour lesquels le PI(4,5)P<sub>2</sub> est important. Par exemple, pour la cytokinèse autant la réduction de la concentration de PI(4,5)P<sub>2</sub> au sillon de clivage que l'accumulation excessive de ce dernier, sont délétères pour les cellules (51, 54, 62). Une coordination spatiotemporelle stricte entre la production et la dégradation du PI(4,5)P<sub>2</sub> est essentielle pour le bon déroulement de la cytokinèse.

Tous ces éléments font des PLC des régulateurs majeurs de plusieurs processus cellulaires (89-91).

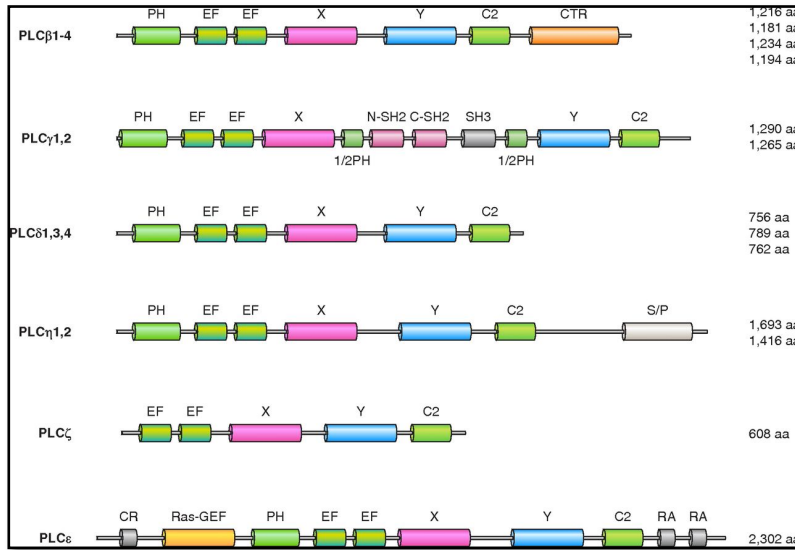
#### **1.3.2.1.1 Structure des PLC**

Chez les humains 13 isoformes de PLC typiques sont connus (68, 89-91). Ces isoformes sont classés dans six classes différentes de PLC : Beta ( $\beta$ ), Gamma ( $\gamma$ ), Delta ( $\delta$ ), Epsilon ( $\epsilon$ ), Zeta( $\zeta$ ) et Eta ( $\eta$ ) (68). Toutes les PLC typiques, partagent une structure de base composée : d'un domaine PH aminoterminal (excepté pour PLC  $\zeta$ ), de 4 mains EF (EF hands), d'un domaine tonneau Triose Phosphate Isomerase (TIM) et d'un domaine C2 (figure 1.10) (68).

##### **1.3.2.1.1.1 Le domaine PH**

Toutes les PLC, excepté la PLC  $\zeta$ , possèdent un domaine PH. Même si la conformation de ces domaines est généralement conservée entre les différentes PLC, ils possèdent différentes fonctions (91). D'un côté, le domaine PH de la PLC  $\delta$ -1 se lie au PI(4,5)P<sub>2</sub> au niveau de la membrane plasmique (91). D'ailleurs, ce domaine couplé à la GFP est très couramment utilisé comme sonde pour étudier le PI(4,5)P<sub>2</sub> (68).





**Figure 1.10 :** les familles des PLC.

La structure minimale des PLC est composée : d'un domaine PH (excepté pour PLC ζ), 4 mains EF, un tonneau TIM (domaines X et Y) et un domaine C2. De plus les PLC β ont une extension C-terminal (CTR). Les PLC γ ont deux domaines SH2 et un domaine SH3 emboîtés entre deux moitiés d'un domaine PH. Les PLC η ont une région riche en sérine et

proline (S/P). Les PLC ε ont un domaine riche en cystéines (CR), un domaine Ras-GEF et deux domaines d'association à Ras (RA) [adaptée de (68)].

Le domaine PH de la PLC γ quant à lui ne lie pas le PI(4,5)P2 mais il est capable de se lier au PI(3,4,5)P3 (91). D'un autre côté, les domaines PH de plusieurs familles de PLC ne lient pas les phosphoinositides et permettent par exemple l'interaction avec les sous-unités βγ des protéines G suite à l'activation des GPCR ou encore interagissent avec la petites GTPases Rac (89-91).

### 1.3.2.1.1.2 Les mains EF

Les mains EF sont des domaines présents dans de nombreuses protéines qui se lient au calcium (89). Une fois liés au calcium, ce domaine subit un changement conformationnel (89) qui stabilise les PLC et active ses fonctions régulées par le calcium (89, 90). Cependant, les domaines EF de certaines PLC comme la PLCβ-3 ne lient pas le calcium et permettent plutôt l'interaction avec des sous unités de la protéine G (89-91).

### 1.3.2.1.1.3 Le tonneau TIM :

Le tonneau TIM est le domaine catalytique des PLC (89-91). Il est composé d'un domaine X et d'un domaine Y, séparé par une région linker autoinhibitrice (excepté pour PLC ζ) (68, 89-91). Cette région agit comme un pseudo-substrat et bloque le site catalytique des PLC (68, 93-95). Suite à la stimulation des PLC par les GPCR ou la liaison au calcium, le mouvement du

linker libère le site catalytique et permet ainsi d'hydrolyser le PI(4,5)P<sub>2</sub> (90). Le domaine X des PLC contient tous les résidus catalytiques nécessaires pour l'hydrolyse du PI(4,5)P<sub>2</sub> (89). Des études par mutagenèse ont démontré que les résidus Histidine à la position 311 et 356 sont nécessaires à la fonction catalytique de la PLC  $\delta$ 1 de rat (96). Le domaine Y quant à lui, est important pour reconnaître les substrats des PLC (89, 90).

#### **1.3.2.1.1.4 Le domaine C2**

Le domaine C2 est formé d'approximativement 120 à 130 acides aminés (97). Chez les mammifères plus de 200 protéines possèdent un domaine C2 (97). La majorité de ces protéines sont périphériques et se lient de façons réversibles à la membrane plasmique (97). Les domaines C2 possèdent plusieurs partenaires de liaisons et sont impliqués dans la transduction du signal au niveau cellulaire (89). Suite à la liaison au calcium, le domaine C2 de la PLC  $\delta$ 1 permet son association à la membrane plasmique et sa liaison aux PI(4,5)P<sub>2</sub> (89, 90). Bien que les résidus, dans les domaines C2, qui lient le calcium, soient bien conservés entre les différentes familles de PLC, il n'est pas encore tout à fait clair si le calcium joue le même rôle pour leurs translocations membranaires (via le domaine C2) (90). De plus, le domaine C2 joue un rôle dans l'interaction entre protéines (90). En effet, le domaine C2 des PLC  $\beta$ , permet l'interaction avec la sous-unité G $\alpha$ q des GPCR et est essentiel pour l'activité catalytique de cette famille de PLC (90).

En plus de ces « modules de bases », chaque famille de PLC possède des modules protéiques spécifiques (figure 1.10). Ces spécificités ne seront pas abordées dans le cadre de cette thèse.

#### **1.3.2.1.1 Activation des PLC**

Au repos, la majorité des PLC sont cytoplasmiques et sont recrutées à la membrane plasmique après leur activation (89, 90, 95). Plusieurs stimuli peuvent activer les PLC : Les PLC  $\beta$ ,  $\epsilon$  et  $\eta$  sont activées par différentes sous unités des GPCR (68, 89-91). Les PLC  $\epsilon$ , peuvent être aussi activées par les petites GTPases Ras et Rho (68, 89-91). De plus, les PLC  $\zeta$  qui constituent la seule famille de PLC qui ne possède pas de domaine PH ne se transloque pas à la membrane lorsqu'elle est activée (68, 89-91). Cette famille de PLC est la plus sensible à la variation de la concentration intracellulaire de calcium (68, 89-91). Dans les spermatozoïdes, la concentration

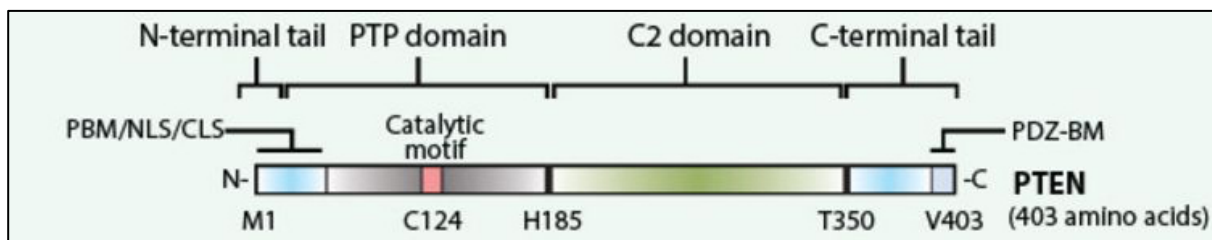
basale intracellulaire de calcium de 100 nM est suffisante à elle seule pour l'activer (68, 89-91). L'interaction du domaine SH2 des PLC  $\gamma$  avec les RTK induit son activation par phosphorylation. Finalement, la famille des PLC  $\delta$  nécessite pour son activation la liaison au calcium et au PI(4,5)P2 avec son domaine PH (68, 89-91).

### 1.3.2.2. PTEN

La Phosphatase et homologue de TENSine déléetée sur le chromosome 10 (PTEN) a été découverte en 1997 (98, 99) par deux groupes indépendants qui recherchaient un suppresseur de tumeur sur la région 10q23. Cette région est souvent touchée par une perte d'hétérozygotie dans des tumeurs de stades avancés (100). De ce fait, *PTEN* est un gène suppresseur de tumeurs (GST) haploinsuffisant, c'est-à-dire dont l'activité régule négativement la prolifération cellulaire uniquement quand les deux copies du gène sont présentes (101-103). Depuis sa découverte, plus de 7800 articles ont décrit les différents aspects de la fonction suppresseur de tumeurs de *PTEN* et son implication dans les cancers ainsi que dans d'autres maladies (100). Ces travaux extensifs sur *PTEN* ont montré que *PTEN* était l'un des GST les plus mutés dans les cancer humains (104). En effet, 30% des patients atteints de cancers présentent une mutation de *PTEN* (105). L'activité enzymatique principale de PTEN est son activité phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphates (PI (3,4,5) P3)-phosphatase spécifique de la position D3 (106, 107) mais il a aussi été démontré qu'un autre substrat pour son activité phosphatase pouvait être certaines protéines.

#### 1.3.2.2.1. La structure de PTEN.

PTEN humain est une protéine de 403 acides aminés (AA) composée de 5 domaines fonctionnels (figure 1.11) (100, 101, 104, 108).



**Figure 1.11** Représentation schématique des différents domaines de PTEN [adaptée de (108)].

#### **1.3.2.2.1.1. Un domaine de liaison au PI(4,5)P2 (PBD)**

Il est situé entre les AA 1 et 15 (105, 109-112). Ce domaine permet, comme son nom l'indique, de lier le PI(4,5)P2 (105). Bien que le PI(4,5)P2 soit le produit de PTEN et non son substrat, cette liaison est importante dans la polarité et la migration cellulaire (100). Ce domaine PBD permet la liaison à la membrane et l'activation de PTEN (105). En plus du PBD, la région N-terminal contient différents signaux importants pour la localisation sous-cellulaire de PTEN (15) :

1- Une séquence de localisation nucléaire (NLS) située entre les résidus 8 et 32.

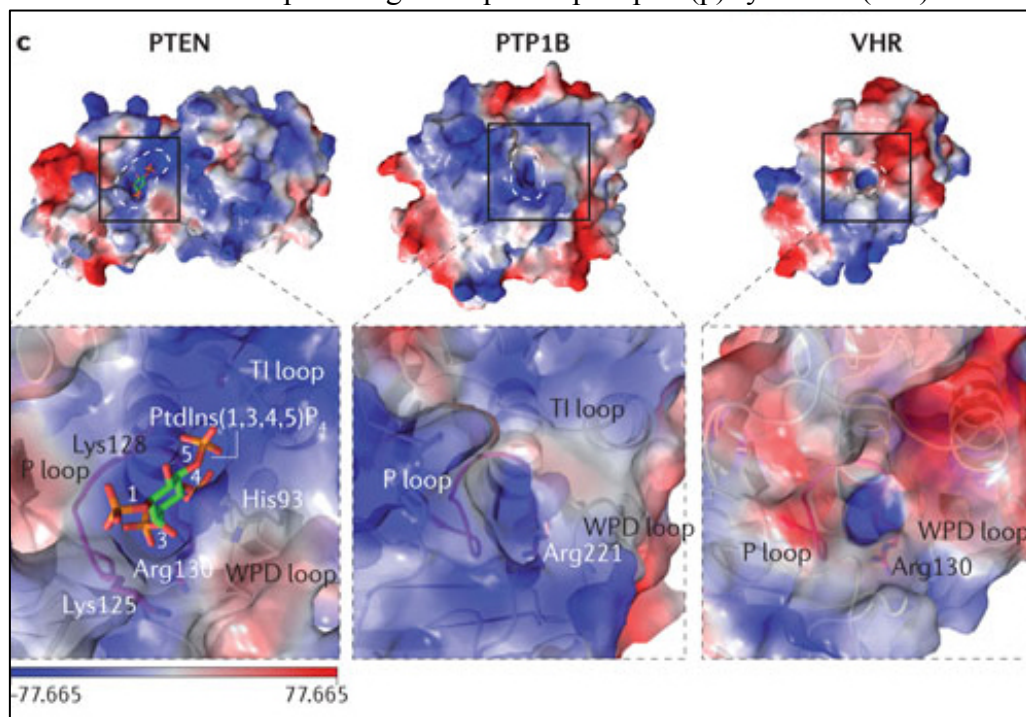
2- une séquence de localisation cytoplasmique (CLS), chevauchante avec le NLS, est située entre les AA 19 et 25 (15).

Le NLS est impliqué dans la translocation de PTEN au noyau. Il a été démontré que la translocation de PTEN jouait un rôle dans de nombreux processus tels que la régulation de la stabilité génomique, la réparation de l'ADN, le cycle cellulaire, l'expression des gènes et, aussi, l'apoptose (105). Le CLS permet, quant à lui, de localiser PTEN dans le cytosplème (101). Le chevauchement des différentes régions pose la question de la priorité du signal. Plusieurs études suggèrent que cette dernière serait déterminée par des modifications post-traductionnelles (100, 101, 105). Ainsi il a été montré que la monoubiquitination de la lysine 13 du NLS de PTEN humain est une condition préalable pour sa translocation nucléaire (105, 113-117). D'autre part, des études de mutagenèses dirigées ont permis de mettre en évidence l'importance de résidus spécifiques tels que 13K-R-R-Y16 (l'équivalent de 18K-K-R-I-R-Y23 chez la drosophile) (105) pour la liaison au PI(4,5)P2 et au transporteur nucléaire (105). Ainsi, une mutation des résidus 13K et R14 en alanine a mis en évidence leur rôle prépondérant dans l'accumulation nucléaire et un rôle mineur dans la liaison au PI(4,5)P2 et donc dans l'activité PI(3,4,5)P3 phosphatase (105). À l'inverse, les résidus 15R-Y16 sont plus impliqués dans la liaison au PI(4,5)P2 que dans la localisation nucléaire (105).

Cette complexité des 15 premiers AA de PTEN montre la nécessité de réguler rigoureusement la localisation et l'activité de PTEN dans des régions bien précises de la cellule (15).

#### **1.3.2.2.1.2. Un domaine phosphatase**

Ce domaine est situé entre les AA 16 et 185 (100, 101, 104, 108). Il est homologue à la super famille des protéines tyrosine phosphatases (PTP) dont le motif catalytique caractéristique est HCxxGxxR (100). Toutefois, le domaine phosphatase de PTEN partage plus d'homologies en termes de séquence avec les phosphatases à double spécificité (DUS). En effet, PTEN montre *in vitro* une activité phosphatase envers les sérines, thréonines et tyrosines phosphorylées (101, 118). Cependant, cette activité envers ces résidus phosphorylés est plus faible comparativement à d'autres phosphatases (100, 118, 119). D'un point de vue structural, le site actif de PTP comme PTPB1 est profond, ce qui lui confère une activité catalytique spécifique vis-à-vis des substrats plus longs tels que les phospho (p)-tyrosines (100).



**Figure 1.12 :** Comparaison structurale du site actif de PTEN, PTP1B et VHR. Le site actif de PTEN est plus large et plus profond que le site de VHR et il est plus large que le site de PTP1B. Les charges basiques sont en bleu et les charges acides en rouge [adaptée de (101)].

Contrairement aux PTP, les DUS tels que VHR, ont un site actif peu profond qui permet de catalyser autant les substrats longs comme les phospho-tyrosines et les substrats courts comme les p-sérines et p-thréonines (100). Le site actif de PTEN (figure 1.12) est plus large et plus profond que celui de VHR (101).

De plus, même si le site actif de PTEN est aussi profond que celui de PTPB1, il est cependant deux fois plus large (101). Le motif catalytique de PTEN est HCKAGKGR, cette séquence lui confère une charge positive avec comme prédiction une activité plus importante envers des substrats avec une charge négative élevée (100, 101). Cette prédiction, associée à un large site actif et une faible activité catalytique envers les p-serines, p-thréonines et p-tyrosines ont permis de spéculer que PTEN aurait comme substrat principal une molécule extrêmement acide non protéique (100, 106, 107). Le PI(3,4,5)P3 possède tous ces critères. Premièrement, le PI(3,4,5)P3 est une molécule qui est plus large que p-serine, p-thréonine et p-tyrosine ce qui concorderait avec le site actif de PTEN qui est plus large et profond que celui des DUS (100, 101). En effet, la mutation G129E trouvée dans plusieurs cancers, réduit la largeur du site catalytique de PTEN sans affecter sa profondeur (100, 101). Cette modification n'a aucun effet sur l'activité catalytique sur p-serine, p-thréonine et p-tyrosine, mais empêche la liaison au PI(3,4,5)P3 qui nécessite un site catalytique intact (100). Deuxièmement, le PI(3,4,5)P3 avec trois groupements phosphate possède une charge négative élevée qui s'emboîte bien avec le site actif de PTEN qui est chargé positivement (100, 101).

Le rôle principal de PTEN est de déphosphoryler le PI(3,4,5)P3 à la position D3 (106, 107, 118). La perte de cette fonction, par exemple par la mutation de la cystéine catalytique en sérine (C124S), entraîne une augmentation du niveau de PI(3,4,5)P3 et une perte d'inhibition de la voie PI3-Kinase-AKT qui stimule la survie et la prolifération cellulaire (101, 120, 121).

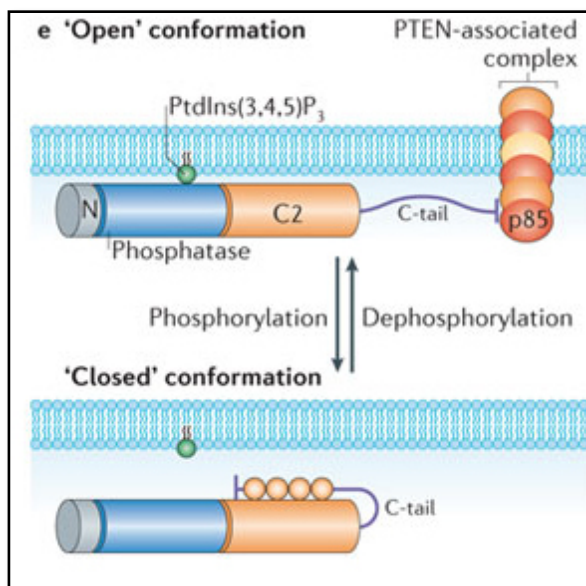
#### **1.3.2.2.1.3. Un domaine C2**

Ce domaine est situé entre les AA 186 et 350 (100, 101, 104, 108). Il possède une structure similaire aux domaines C2 qui permettent la liaison à la membrane dépendamment du calcium (100). Cependant, le domaine C2 de PTEN ne possède pas la boucle catalytique nécessaire à la liaison au calcium (100). Ce domaine permet de lier les phospholipides membranaires (101). Contrairement aux domaines de liaison aux lipides tels que les domaines PH, PX ou FYVE qui ont un site de liaison bien spécifique juxtaposé à une région cationique (122). Le domaine C2 ne possède ni une région bien définie pour lier les lipides ni de patch cationique (20). Le domaine C2 permet de recruter PTEN à la membrane plasmique et faciliterait le positionnement du domaine catalytique (100). De plus, il a été démontré que le domaine phosphatase et le domaine C2 représentent l'unité enzymatique minimale permettant de métaboliser le PI(3,4,5)P3 (104, 123). Le domaine C2 joue aussi un rôle dans la régulation de

l'activité de PTEN. Il a été démontré que le domaine C2 s'associe au domaine Carboxy (C)-terminal afin de maintenir une conformation fermée de PTEN qui le stabilise, le détache de la membrane et le rend inactif (100, 123). À l'opposé, la phosphorylation du domaine C2 au niveau de S229, T232, T319 et T321 par la kinase associée à la protéine Rho-A (ROCK) active PTEN et permet sa translocation vers la membrane plasmique (100, 104).

#### 1.3.2.2.1.4. Le domaine C-terminal

Ce domaine se situe entre les AA 351 et 403. Il est constitué d'une queue C-terminale et d'un motif de liaison aux protéines PDZ (100). Il est désordonné et ne possède pas une architecture particulière (100). À l'inverse des phosphorylations des domaines C2 qui promeuvent l'activation de PTEN, la phosphorylation du domaine C-Terminal sur les résidus S362, T366, S370, S380, T382, T383, S385 et S398 inhibe l'activité de PTEN (100, 101). En effet, ces phosphorylations entraînent une association intramoléculaire entre le domaine C-terminal et le domaine C2 (figure 1.13) (100).



**Figure 1.13** : Modèle de la régulation conformationnelle de PTEN [adaptée de (101)].

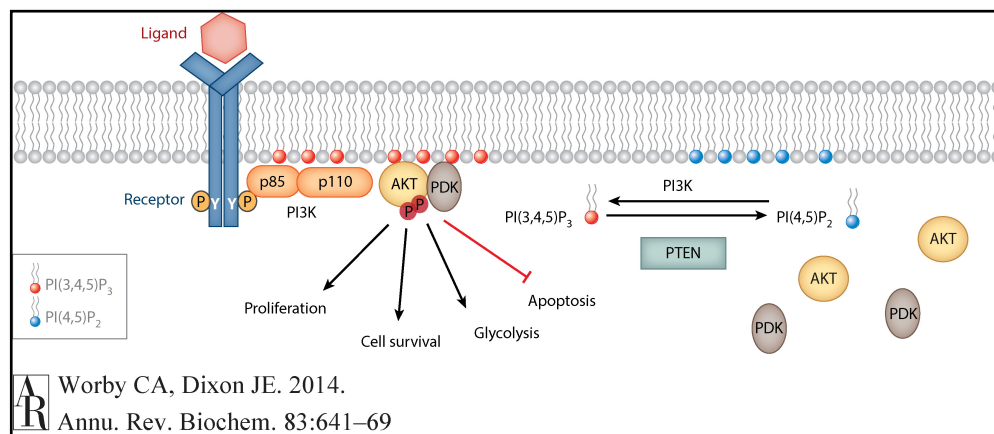
Cette conformation fermée masque le domaine de liaison à la membrane de PTEN et stabilise la protéine inactive (101). De plus, elle empêche l'interaction de PTEN avec ses interacteurs via le motif de liaison au PDZ (100).

#### 1.3.2.2.2. Fonctions de PTEN

*PTEN* est un des gènes supresseurs de tumeur (GST) les plus mutés dans les cancers (105). En effet, 30 % des cancers humains présentent une baisse ou une perte de l'activité de PTEN (105). Étant donné que la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR est très importante pour la prolifération, la survie cellulaire et le métabolisme. Une dérégulation positive de cette voie

suite à la diminution de la fonction de PTEN peut causer le cancer (Figure 1.14) (100, 101, 104).

PTEN est important pour plusieurs fonctions cellulaires telles que : la croissance cellulaire et le métabolisme, l'apoptose, la polarité cellulaire, la migration, le cycle cellulaire, la sénescence et le renouvellement des cellules souches (figure 1.14) (100, 101, 104). Même si la majorité de ses fonctions dépendent de l'activité phospholipide-phosphatase réduisant le niveau de PI(3,4,5)P<sub>3</sub>, certaines fonctions moins connues sont plutôt dépendantes de son activité protéines-phosphatases ou même sont totalement indépendantes de toute activité phosphatase (100). PTEN est impliquée dans des processus cellulaires multiples et variés (104). De ce fait, elle nécessite une régulation précise et convenable afin de lui permettre d'avoir la bonne fonction au bon moment (100, 101). Ces régulations incluent (sans être exhaustif) : la phosphorylation, l'ubiquitination, l'acétylation, l'oxydation, la SUMOylation, la régulation transcriptionnelle (positive ou négative), la régulation par microARN et la régulation épigénétique (100, 101, 104).



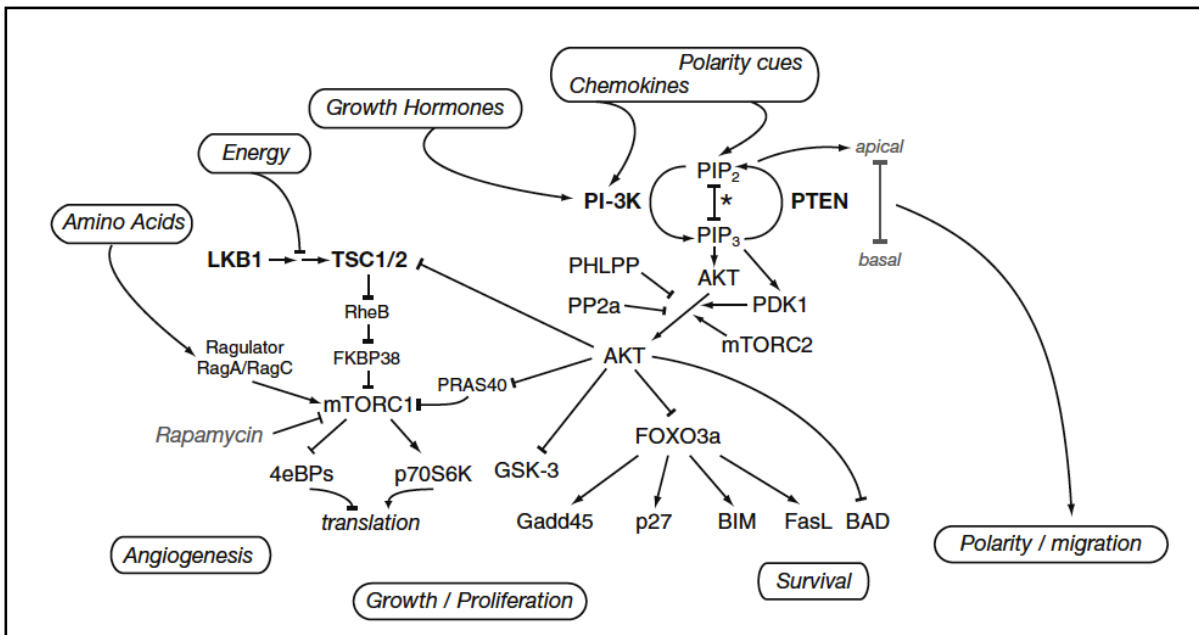
**Figure 1.14** : Fonctions cellulaires de PTEN [adaptée de(100)]

Dans le cadre de cette thèse, nous n'allons pas entrer dans les détails de toutes les fonctions de PTEN, ni de toutes les formes de régulation de cette dernière. Nous n'allons aborder que les aspects que nous considérons pertinents pour notre recherche.

### 1.3.2.2.2.1. Polarité cellulaire et migration



Le rôle de PTEN dans la migration et la polarité cellulaire a été étudié dans le contexte de la chimiotaxie de *Dictyostelium discoideum* (100). Pour permettre la migration directionnelle, des petites GTPases (comme Rho et Ras) régulent la production du PI(3,4,5)P3 localement via l'activité de la PI-3 Kinase et de PTEN (124). La PI3-Kinase s'accumule rapidement sur le front de migration en réponse au chimioattractant (125).



**Figure 1.15** : Voies de signalisation régulées par PTEN [adaptée de (124)].

En revanche PTEN est recrutée à l'arrière et sur les côtés de la cellule, afin de déphosphoryler le PI(3,4,5)P3 et de le restreindre au front de migration (124). En effet, la production de PI(3,4,5)P3 entraîne l'activation des petites GTPases Rac et Cdc42 qui vont permettre la nucléation de l'actine (via Arp2/3 et Wave/WASP) et sa polymérisation (125). PTEN, quant à elle, produit du PI(4,5)P2 sur les côtés et à l'arrière de la cellule. Elle est associée à l'activation de la petite GTPase Rho (125). Cette dernière antagonise l'activation de Rac et inhibe ainsi la formation de protrusions ailleurs que sur le front de migration (125). Ainsi, la perte de PTEN entraîne une répartition homogène du PI(3,4,5)P3 tout autour de la cellule (100). Cette répartition entraîne la polymérisation uniforme de l'actine et la formation de protrusions latérales, réduisant ainsi la migration directionnelle (100).

### 1.3.2.2.2. Prolifération, survie et métabolisme

Suite à la perte de PTEN, le PI(3,4,5)P3 s'accumule à la membrane plasmique ce qui induit l'activation de certaines protéines contenant un domaine d'homologie à la Pleckstrine (PH), dont AKT et PDK1 (101). AKT est activée par phosphorylation, elle est phosphorylée par PDK1 sur le résidu T308 et par mTORC2 sur S473 (101). Premièrement, PTEN régule négativement la prolifération en inhibant la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR. AKT phosphoryle la protéine de la famille FOX, FOXO3a ce qui entraîne une baisse de la transcription des inhibiteurs du cycle cellulaire P27 et GADD45 (124). AKT phosphoryle aussi les inhibiteurs directs et indirects de mTORC1, tels que PRAS40 et TSC2, permettant ainsi l'augmentation de la traduction et de la synthèse protéique (124). En outre, PTEN possède aussi une fonction proapoptotique en régulant négativement AKT (124). AKT régule négativement l'apoptose, et ce, de manière directe et indirecte (124). Directement : AKT phosphoryle la protéine proapoptotique BAD et l'inactive (124). En parallèle, AKT en phosphorylant FOXO3a, réduit l'expression des gènes, proapoptotiques, des ligands de Fas et de BIM (124). Finalement, AKT phosphoryle et régule plusieurs cibles impliquées dans la régulation du métabolisme (100). Dans les cellules musculaires et graisseuses, AKT active la glycogène synthase, essentielle à la glycogénogenèse et au stockage du glucose, en phosphorylant et inhibant la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) (figure 1.15) (100). En plus, AKT favorise l'absorption du glucose en augmentant la localisation membranaire du transporteur de glucose GLUT4(100). En parallèle à l'augmentation du stockage du glucose, AKT active la lipogenèse à travers l'inhibition de GSK3 (101). En effet, des souris qui n'expriment pas PTEN au niveau du foie, montrent une hépatomégalie avec une accumulation de triglycérides cytoplasmique (100). Ensemble, ces données montrent le rôle important que joue PTEN, non seulement, dans la prévention de formation de cancer, mais aussi dans la prévention du diabète et de l'obésité (100, 101, 126).

#### **1.3.2.2.2.3. Fonctions de PTEN dans le noyau**

Des recherches récentes ont montré que PTEN peut être transloquée de la membrane plasmique vers le noyau cellulaire (101, 127). En effet, PTEN nucléaire régule le cycle cellulaire, la stabilité génomique et la réparation de l'ADN (101) (Figure 1.16).

Toutefois, le bassin de PI(3,4,5)P3 nucléaire n'est pas sensible à la catalyse par PTEN (101, 128). De plus, la perte de localisation de PTEN dans le noyau est associée à des cancers plus agressifs (101, 104, 129). Finalement, l'apoptose causée par PTEN nucléaire est indépendante

de son activité phosphatase, en effet le mutant PTEN catalytique inactif C124S est toujours capable de promouvoir l'apoptose (114, 130). Ensemble, ces données, démontrent que PTEN joue un rôle important dans le noyau, ce rôle est indépendant de sa fonction canonique de réduire le niveau de PI(3,4,5)P3 (104).

PTEN joue différents rôles dans le noyau (130), tels que :

#### 1.3.2.2.2.3.1. **Préserver la stabilité génomique**

Il a été montré que la perte de l'expression de PTEN entraîne une augmentation des anomalies chromosomiques (130). Ces anomalies sont souvent associées à des cassures des centromères et à des translocations chromosomiques (130). Il a été montré que PTEN colocalise dans le noyau et interagit physiquement avec la protéine associée aux centromères CENP-C (100, 130). Cette liaison est essentielle pour la stabilité du kinétochore (104). Cette liaison est dépendante de la région C-terminale de PTEN (130) et ne dépend pas de l'activité phosphatase de cette dernière (29).

#### 1.3.2.2.2.3.2. **Réparation de l'ADN**

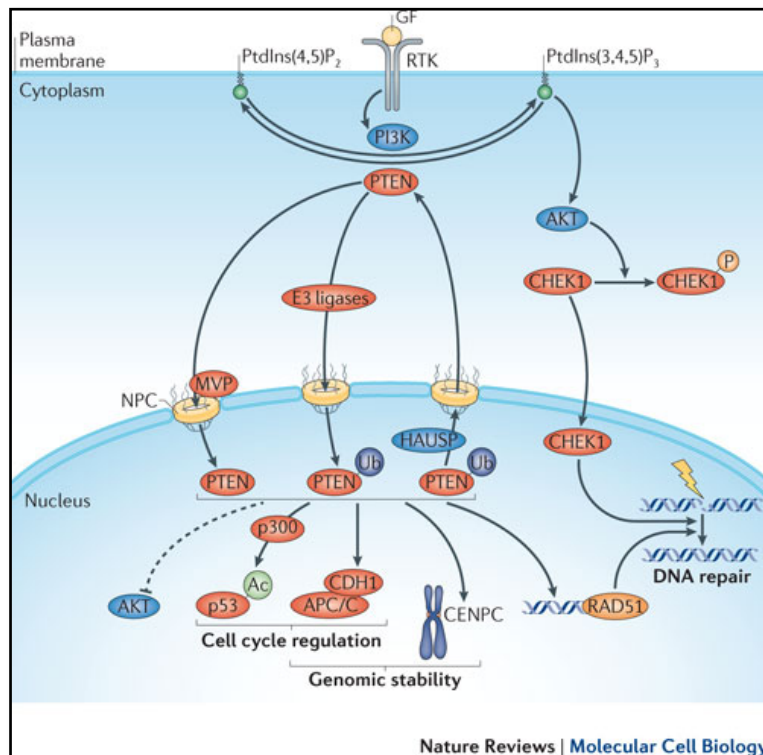
Il a été montré que la perte d'expression de PTEN régule négativement le niveau d'expression de la protéine RAD51 (131). Cette protéine joue un rôle important dans la réparation des cassures doubles brins de l'ADN (100). Cette fonction de PTEN dépend de son activité phosphatase, le mutant catalytique inactif PTEN C124S n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de RAD51 (130, 131).

#### 1.3.2.2.2.3.3. **Régulation du cycle cellulaire**

Dans le noyau PTEN régule le cycle cellulaire, en régulant positivement l'activité de l'E3 ligase du Complexe de Promotion de l'Anaphase (APC) (101). L'APC est une E3 ubiquitine-ligase dont l'activation est restreinte à la phase G1 et à l'anaphase (130). L'APC, en ubiquitinant des composants du cycle cellulaire, régule leur expression et leur stabilité (130). PTEN, de façon indépendante de son activité phosphatase, favorise la liaison de l'APC à son activateur CDH1 (101, 130). Cette interaction active la fonction suppresseur de tumeurs de l'APC qui induit la dégradation d'oncogènes tels que les kinases PLK1 et Aurora A (101). La perte de PTEN entraîne une réduction de l'activité de l'APC, causant ainsi l'accumulation de PLK1 et Aurora A (130).

#### 1.3.2.2.2.3.4. Translocation de PTEN dans le noyau

Le mécanisme de translocation de PTEN et sa fonction nucléaire ne sont pas encore complètement élucidés (101, 104). Pour la localisation nucléaire, il a d'abord été rapporté que l'import nucléaire de PTEN dépend de la liaison à la protéine de Voute majeure (MVP) (130, 132). Par la suite, une autre équipe de chercheurs a démontré que l'import nucléaire de PTEN dans le noyau dépendait de l'association avec la petite GTPase Ran (114, 130). D'autres chercheurs, quant à eux, ont décrit que PTEN, ayant un poids moléculaire de 55 kilodaltons (kDa), peut diffuser passivement à travers les pores du noyau. Ces derniers, permettent aux protéines inférieures au poids moléculaire de 60 kDa de diffuser (130, 133). En parallèle, plusieurs séquences NLS atypiques ont été décrites chez PTEN (130, 132) ces NLS sont situés entre les AA suivants : NLS1 AA10-14 (dans le domaine PBD), NLS2 AA160-164 (dans le domaine phosphatase), NLS3 AA 233-237 et NLS4 AA 265-269 (tous les deux dans le domaine C2) (132).



**Figure 1.16 :** Fonctions nucléaires de PTEN [adaptée de (101)].

En plus des différents types de translocations nucléaires, des modifications post traductionnelles ont été démontrées comme nécessaires à l'entrée nucléaire de PTEN, rajoutant ainsi un niveau de complexité pour ce processus (105, 114, 116, 117, 129) .

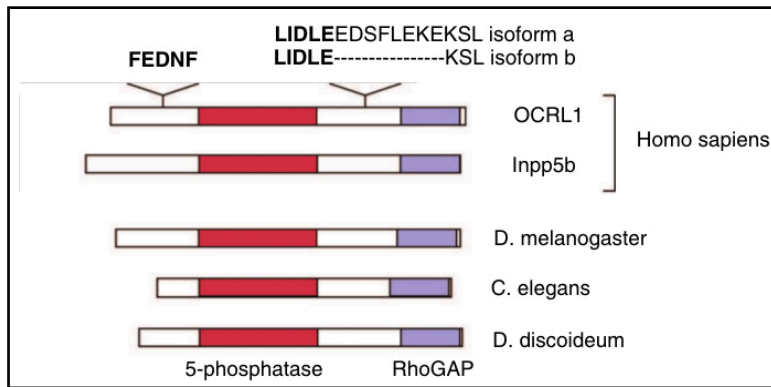
En effet, les mutations ponctuelles des lysines 13 (dans le domaine PBD) et 289 (dans le domaine C2) de PTEN, qui sont identifiées comme causant le cancer, réduisent la localisation nucléaire de PTEN (116, 117, 130). Ces résidus ont été identifiés comme monoubiquitinés par

la E3-ligase NEDD4 (116, 117). La mutation de l'un ou l'autre de ces résidus entraîne la baisse de la localisation nucléaire (130). La combinaison des deux mutations entraîne une exclusion nucléaire de PTEN et une réduction de sa fonction pro-apoptotique (130). En plus de la monoubiquitination, il a été montré que la mutation de la lysine 254 (dans le domaine C2) abrogeait la SUMOylation de PTEN et sa translocation vers le noyau (129). Pour finir, le clivage du domaine C-terminal de PTEN par la Caspase-3 est suffisant, mais non nécessaire, à la translocation de PTEN dans le noyau (114).

La complexité de la régulation de la translocation de PTEN vers le noyau, associée à sa fonction indépendante de son activité phosphatase, peu connue, démontre que nous sommes loin d'avoir élucidé toutes les voies de signalisation régulant et régulées par PTEN (101, 130).

### 1.3.2.3. OCRL1

La protéine OCRL1 est une phosphoinositide-5 phosphatase qui déphosphoryle préférentiellement le PI(4,5)P<sub>2</sub> à la position D5 pour produire du PI(4)P (68, 134, 135). Elle est codée par le gène *OCRL* pour Occulo-Cerebro-Renal syndrome de Lowe, qui est composé de 24 exons et situé sur le chromosome X (135). Des mutations sur le gène *OCRL*, sont la cause d'une maladie génétique rare : le syndrome de Lowe (SL) (136). OCRL1 est l'une des 10 Inositol-5 phosphatases présentes chez les vertébrés (134, 137). Elles ont pour rôle de déphosphoryler les phosphatidylinositols à la position D5 (68). Chez les mammifères, OCRL1 et Inpp5b (une autre 5-Phosphatase) sont deux homologues qui partagent la même organisation en terme de domaines protéiques (134, 135). Il s'agit, chez l'humain, des deux seules PI-5Phosphatases contenant un domaine Rho GAP-like (135, 138). Ces deux phosphatases possèdent 45% d'identité de séquence au niveau protéique (135). Il a été montré qu'OCRL1 et Inpp5b présentent une certaine activité redondante, en effet, la perte de l'expression de l'un ou de l'autre chez la souris est presque aphenotypique (stérilité chez les mâles) (139). Alors que la perte d'expression de Inpp5b et OCRL1 présente une létalité embryonnaire précoce (139). En plus de la compensation fonctionnelle entre Inpp5b et OCRL1, cette dernière présente, chez l'humain, deux isoformes obtenues par épissage alternatif (135). En effet, la séquence de l'isoforme OCRL1b est dépourvue des huit A.A adjacents au deuxième motif de liaison à la clathrine 702 LIDLE 706 (figure 1.17) (135).

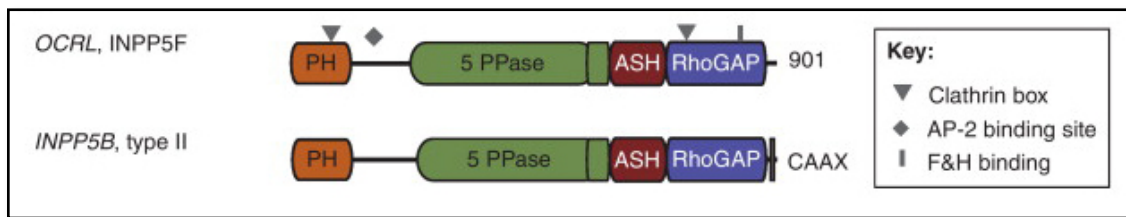


**Figure 1.17 :** Représentation schématique des 5-phosphatases contenant un domaine Rho-GAP like. Le motif FEDNF permet la liaison à l'alpha-adaptine. Le motif LIDLE permet la liaison à la clathrine [adaptée de (135)].

Cette boucle plus petite, réduit ainsi l'accessibilité à la clathrine et présente une affinité plus faible envers cette dernière comparée à l'isoforme OCRL1a (134, 140). À part dans le cerveau, les deux isoformes sont exprimées dans tous les tissus avec une plus forte expression de l'isoforme OCRL1b (135, 141). Dans le cerveau, seule l'isoforme longue (OCRL1a) est exprimée (135).

### 1.3.2.3.1. Structure d'OCRL1

OCRL1 est une protéine possédant plusieurs domaines : un domaine PH à l'extrémité aminotermine de la protéine, un domaine central PI-5phosphatase, un Domaine ASH et d'un domaine Rho-GAP like catalytiquement inactif (figure 1.18) (134).



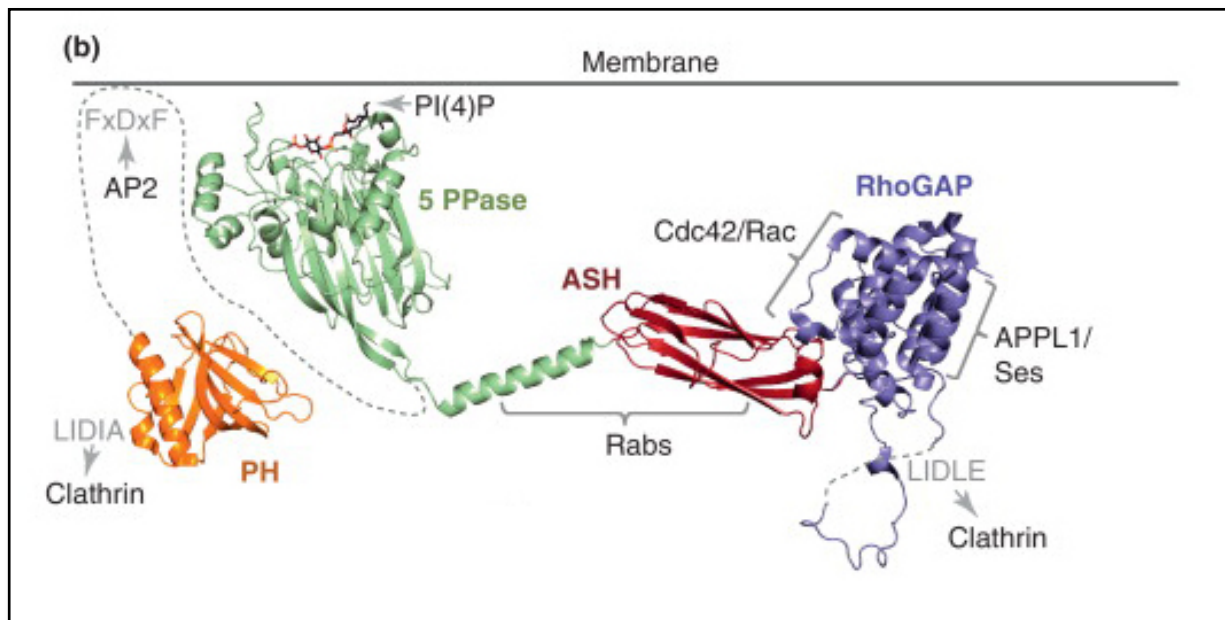
**Figure 1.18 :** Comparaison de l'organisation protéique d'OCRL1 et d'INPP5B [adaptée de (142)].

#### 1.3.2.3.1.1. Le domaine PH

Le domaine PH d'OCRL1 est atypique, il ne fut découvert qu'en 2009 à l'aide de la technique de spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (143). Ceci est dû au fait que la séquence protéique de ce domaine ne correspond pas aux autres domaines PH (134, 144). En effet, ce

domaine ne possède pas la région polybasique qui permet la liaison aux phosphoinositides (142, 143). Ce domaine PH ne permet donc pas la liaison aux liposomes contenant des phosphoinositides, mais pourrait être impliqué dans l'interaction avec d'autres protéines (134, 143, 145). Aussi, dans une boucle du domaine PH est présent un premier motif de liaison à la clathrine non conventionnel (143, 144). Puisque, ce motif de liaison à la clathrine 73-LIDIA-77 ne se termine pas par résidu acide à la cinquième position (contrairement au deuxième motif de liaison à la clathrine 702-LIDLE-706, qui est conventionnel) (143). Ces domaines de liaison à la clathrine permettent le recrutement d'OCRL1 sur la membrane plasmique et plus précisément vers les puits endocytiques recouverts de clathrine (134). Ils localisent aussi OCRL1, sur les vésicules recouvertes de clathrines au niveau des endosomes et au réseau trans-Golgi (TGN) (142).

Le domaine PH est connecté au domaine 5-phosphatase avec un domaine de liaison (linker) flexible contenant un motif 151-FEDNF-155 responsables de la liaison à l'adaptateur de clathrine AP2 (figure 1.19) (134). Ce dernier permet, en liant à la fois le PI(4,5)P<sub>2</sub>, les motifs endocytiques des récepteurs transmembranaires et les triskèles de clathrines, d'initier la nucléation des puits de clathrines (146).



**Figure 1.19** : Structure d'OCRL1 (Adaptée de (142))

#### **1.3.2.3.1.2. Le domaine phosphatase**

OCRL1 et Inpp5b sont des enzymes de type II qui peuvent hydrolyser les phosphoinositols PI(4,5)P2 et PI(3,4,5)P3, ainsi que les inositols solubles Ins(1,4,5)P3 et Ins(1,3,4,5)P4 (135, 138, 147-149). Cependant, seule OCRL1 présente une faible activité phosphatase envers PI(3,5)P3 (149). Comme les autres membres des phosphatases de classe II, chacune des enzymes a des préférences distinctes de substrats (135). OCRL1 démontre une préférence envers le PI(4,5)P2 (135). Pour OCRL1, selon le pourcentage relatif d'hydrolyse, l'ordre de préférence des substrats est le suivant : PI(4,5)P2 > Ins(1,4,5)P3 > Ins(1,3,4,5)P4 = PI(3,4,5)P3 > PI(3,5)P3 (149). Cette préférence pourrait être expliquée par une meilleure affinité d'OCRL1 envers le PI(4,5)P2 (150). Inpp5b préfère aussi le PI(4,5)P2 comme substrat (135).

#### **1.3.2.3.1.3. Le Domaine ASH,**

Après le domaine 5-phosphatase d'OCRL1 se trouve une courte hélice qui le connecte au domaine ASPM-SPD2-Hydin (ASH) (142). Ce domaine possède un repliement protéique qui ressemble aux immunoglobulines et il est souvent retrouvé dans les protéines ciliaires et centrosomales (142, 150). Ce domaine se lie aux petites GTPases de la famille Rab et il est très important pour la localisation sous-cellulaire d'OCRL1 (151). Il est intéressant de noter, qu'OCRL1 se lie aux petites GTPases Rab de façon atypique comparativement à d'autres protéines effectrices des Rab (134). Ceci pourrait expliquer l'interaction d'OCRL1 avec plusieurs petites GTPases (134). En effet, OCRL1 est capable d'interagir ou de colocaliser avec au moins 19 petites GTPases différentes (54, 142, 152, 153). Ces interactions avec les petites GTPase Rab, qui régulent le trafic vésiculaire, permettent de localiser OCRL1 au niveau des membranes vésiculaires (endomembranes) (54, 142, 151, 153, 154).

#### **1.3.2.3.1.4. Le domaine Rho-GAP like**

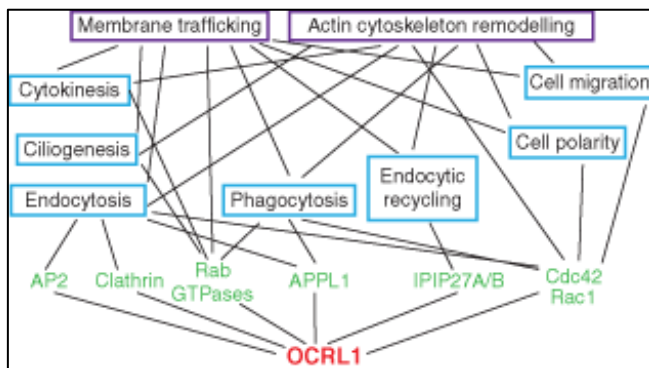
Le domaine Rho-GAP like est localisé dans la partie carboxy-terminal de la protéine OCRL1 (142). Il est dépourvu de l'arginine catalytique essentielle à la fonction activatrice des GAP (135, 155). Cette mutation réduit considérablement l'activité GAP d'OCRL1, qui ne présente qu'une faible activité envers Rac1 (135, 156). Il a été démontré que ce domaine permet la liaison aux petites GTPases Rac et CDC42 (156, 157). Contrairement à la liaison à CDC42 qui ne se fait qu'avec la forme liée au GTP, la liaison à Rac est atypique et elle est possible sous sa forme liée au GDP ou au GTP (135, 142, 156, 157). Cette liaison permet la localisation



d'OCRL1 au niveau des sites de polymérisation de l'actine (134, 156, 157). Comme pour le domaine PH, une boucle qui s'étend à l'extérieur du domaine Rho-GAP like permet la liaison à la clathrine (140, 158, 159). De plus, le domaine Rho-GAP like permet l'interaction avec trois protéines endocytiques APPL1, IPIP27A et IPIP27B (134, 142, 145, 160, 161). Le domaine Rho-GAP like d'OCRL1 se lie aux motifs de liaison riche en histidines et phénylalanine (motif F&H) présents sur ces trois protéines endocytiques(134). APPL1, est un effecteur endosomal de la petite GTPase Rab5 (142, 162). APPL1 est présent sur certains endosomes positifs pour OCRL1 (161). Il est aussi présent sur une sous-population d'endosomes précoces périphériques en amont des endosomes positifs pour le PI(3)P (142). IPIP27 et B compétitionnent avec APPL1 pour la liaison d'OCRL1 et ils sont mutuellement exclusifs (161). Quand les endosomes précoces commencent à mûrir et acquièrent du PI(3)P sur leurs endomembranes, les protéines IPIP27 déplacent APPL1 de la surface de liaison au motif F&H d'OCRL1 (142). La partie C-terminal d'OCRL1 composée des domaines ASH et RhoGAP like contrôle la majorité des interactions protéiques avec OCRL1 (142). Elle joue aussi un rôle primordial dans la localisation sous-cellulaire d'OCRL1 au niveau des endosomes et du TGN (142).

### 1.3.2.3.2. Fonctions d'OCRL1

Grâce à ces multiples interactions protéiques décrites précédemment, OCRL1 se localise dans plusieurs compartiments cellulaires (134). Dans ces différents compartiments, OCRL1 possède différents rôles cellulaires, tels que présentés dans la figure 1.20 (134, 135).



**Figure 1.20 :** Fonctions cellulaires régulées par OCRL1 [adaptée de (134)].

Parmi ces rôles nous allons particulièrement nous intéresser au trafic membranaire, à la phagocytose, à la migration, à l'adhésion cellulaire et à la cytocinèse. Tous ces processus dépendent de deux fonctions primordiales d'OCRL1 qui sont : la régulation du trafic membranaire et le remodelage du cytosquelette d'actine (134).

#### **1.3.2.3.2.1. Remodelage du cytosquelette d'actine**

OCRL1 joue un rôle important dans le remodelage du cytosquelette d'actine. En effet, dans des cellules provenant de patients atteints du syndrome de Lowe et dans des cellules déplétées pour OCRL1, une déficience du cytosquelette d'actine est observée (134, 135). Cette dernière consiste en une accumulation ectopique d'actine sur les endosomes (163) et une perte des longues fibres de stress (163, 164). OCRL1 qui localise sur les endomembranes, régule négativement la polymérisation d'actine (134). Cette fonction passerait par la diminution de la concentration endomembranaire de PI(4,5)P2 (134). Ceci bloque les mécanismes pro-polymérisation de l'actine qui dépendent du PI(4,5)P2 (susmentionnés dans la section 1.3.1.2). Inversement, la déplétion d'OCRL1 entraîne une augmentation de la concentration endomembranaire du PI(4,5)P2 et cause une polymérisation ectopique de l'actine sur les endosomes (163).

#### **1.3.2.3.2.2. Trafic membranaire**

Plusieurs études ont démontré l'implication d'OCRL1 dans le trafic membranaire (54, 134, 140, 143, 157, 159, 160, 163, 165-167). OCRL1 se localise sur plusieurs endosomes différents, dont les endosomes de recyclage et les endosomes précoces (54, 159, 163). Elle se localise aussi au niveau du TGN (135, 156, 158, 168, 169). Un de ses rôles est de réguler le trafic vésiculaire bidirectionnel entre le TGN et les endosomes (134, 135). En effet, la perte d'OCRL1 entraîne un élargissement des endosomes et la perturbation du transport de protéines cargo des endosomes vers le TGN (159, 163). La déplétion d'OCRL1 entraîne la redistribution des protéines TGN46, impliqué dans le transport rétrograde des endosomes vers le TGN, au niveau des endosomes précoces (135, 159). Ceci montre le rôle d'OCRL dans le trafic rétrograde entre les endosomes et le TGN (159). Parallèlement, il a été montré qu'OCRL1 colocalise avec la petite GTPase Rab 31 responsable du transport du récepteur de mannose 6-phosphate du TGN vers les endosomes (154, 170). Il a aussi été montré qu'OCRL1 est impliquée dans le transport de récepteurs tels que la Megaline et la transferrine des endosomes précoces vers la membrane (163, 171). La perte d'OCRL1 entraîne l'accumulation ectopique de ces récepteurs dans les endosomes et pourrait expliquer certaines pertes de la fonction rénale observées chez les patients atteints du syndrome de Lowe (PSL) (163, 171).

Tous ces résultats démontrent qu'OCRL1 joue un rôle important pour plusieurs voies de signalisation du trafic membranaire. Mais comment est-ce que OCRL1 régule le trafic membranaire? Il semblerait que les fonctions d'OCRL1 dans ce processus passeraient par une régulation de l'identité phospholipidique des différentes endomembranes et par une régulation de l'homéostasie du PI(4,5)P<sub>2</sub> (134).

Dans une situation normale, le PI(4,5)P<sub>2</sub> qui est majoritairement présent sur la membrane plasmique, n'est détectable sur les endosomes que durant les toutes premières étapes de la formation des puits d'endocytose (172). Une fois l'invagination et le détachement de l'endosome terminés, les activités 5-phosphatase successives de SHIP1, suivies par Synaptojanine et enfin OCRL1 permettent l'hydrolyse du PI(4,5)P<sub>2</sub> sur les endosomes (172). À part à la membrane plasmique, seule une petite fraction de PI(4,5)P<sub>2</sub> est détectée au niveau de l'appareil de Golgi (Golgi) et du noyau (173, 174). D'autre part, sur le TGN, OCRL1 hydrolyse le PI(4,5)P<sub>2</sub> pour produire du PI(4)P (134). Ce phosphoinositide est primordial pour le bon fonctionnement du Golgi et il est nécessaire pour plusieurs processus tels que la formation de membranes, la synthèse de sphingolipides et le trafic vésiculaire (172, 173, 175). Parmi les processus régulés par le PI(4)P au niveau du Golgi :

- 1- La petite GTPase Arf1 coopère avec le PI(4)P pour réguler le triage vésiculaire (173).
- 2- Le PI(4)P lie la protéine Sec2 une GEF (Guanosine exchange factor) des petites GTPases Rab et régule le trafic vésiculaire (175).
- 3- Chez les cellules de mammifères la Golgi-phosphoprotéine 3 (GOLPH3) est un effecteur du PI(4)P qui permet le recrutement de la myosine MYO18A(173). La Perte de GOLPH3 entraîne une perturbation du trafic vésiculaire et une morphologie anormale du Golgi (173).

Toutefois, lorsque la fonction d'OCRL1 est réduite ou perdue, nous observons une accumulation ectopique de PI(4,5)P<sub>2</sub> sur les endosomes et sur le TGN. Cette accumulation abolit la signature lipidique spécifique à chacune des familles d'endomembranes (134). Entraînant, ainsi, l'élargissement des endosomes, l'accumulation d'actine sur ces derniers (grâce aux mécanismes susmentionnés), et une complète désorganisation du trafic membranaire et de la fonction du Golgi (159, 163).

Ces phénotypes observés lors de la perte de la fonction d'OCRL1, ne sont pas sauvés par l'expression de mutants d'OCRL1 dépourvus du domaine phosphatase ou catalytiquement

inactifs (159, 163). Ceci démontre que la fonction phosphatase d'OCRL1 est importante pour le maintien d'une signature phospholipidique unique de ces organelles (176).

#### **1.3.2.3.2.3. Migration cellulaire**

Il a été démontré qu'OCRL1 se localise au niveau des lamellipodes (177, 178). Cette localisation est associée à un rôle possible d'OCRL1 durant la migration cellulaire (134, 177, 178). Effectivement, des cellules fibroblastes déplétées pour OCRL1 ou provenant de patients du syndrome de Lowe (PSL) présentent des défauts de migration (178). Cette perturbation de la migration par la perte d'OCRL1 passerait par la dérégulation du cytosquelette d'actine (134). Au niveau des lamellipodes, lorsque l'activité d'OCRL1 est réduite (par ARNi ou chez les PSL), les niveaux de la petite GTPase Rac1 et de la cofilline sont réduits (134, 166). Cette régulation passe par la modulation de PI(4,5)P2 au niveau des lamellipodes (134). D'un côté, l'accumulation du PI(4,5)P2 perturbe la polymérisation de l'actine via la cofiline (134). D'un autre côté, elle régulerait la localisation de Rac1 en modulant la composition phospholipidique des lamellipodes (134, 179). En effet, les petites GTPases de la famille Rho possèdent des régions polybasiques leur permettant de se lier à différents types de phosphoinositides (71, 179). La modification de la concentration de PI(4,5)P2 au niveau des lamellipodes pourrait interférer avec le recrutement de Rac1. Parallèlement, OCRL1 pourrait réguler l'activité de Rac en régulant son trafic vésiculaire (134, 180). Il est intéressant de noter que ni la surexpression d'INPP5b, ni celle d'OCRL1 mutée aux sites de liaison de la clathrine ne restaure une migration normale (178). La surexpression d'OCRL1 sauvage, en revanche, est capable de sauver le phénotype de migration (178).

Sachant qu'INPP5b partage la majorité des domaines d'OCRL1 sauf pour les domaines de liaison à la clathrine, ceci pourrait expliquer pourquoi INPP5b ne peut compenser que partiellement la perte d'OCRL1 (142, 178)

#### **1.3.2.3.2.4. Ciliogénèse**

Les cils primaires sont des organelles sensorielles qui se projettent de la surface apicale de la majorité des cellules de mammifères (181, 182). Dans une cellule, un cil primaire unique agit comme une « antenne cellulaire » (182). Ce dernier sent l'environnement extracellulaire et permet la transduction de signal important pour plusieurs voies de signalisation (181, 182).

Les cils sont des organelles formées de microtubules organisés à partir d'une ancre centriolaire connue comme le corps basal (181, 182). Une des étapes clés de la ciliogénèse est le trafic de vésicules ciliaires primaires dérivées du Golgi vers le centriole mère. OCRL1 jouerait un rôle important dans ce processus (181, 182).

Plusieurs études ont démontré l'implication d'OCRL1 dans la formation des cils cellulaires (134, 183-185). La mutation ou la déplétion d'OCRL1 entraîne une réduction de la taille et du nombre des cils cellulaires dans des fibroblastes de PSL et dans des cellules NIH3T3 et hTERT-RPE (181, 184, 185). À l'inverse, la taille des cils cellulaires est augmentée dans les cellules MDCK (183). Cet effet variable suggère un rôle d'OCRL1 spécifique pour chaque tissu (134, 181).

OCRL1 régulerait la ciliogénèse d'au moins deux façons (181). Premièrement OCRL1 se lie à la petite GTPase Rab8 qui est essentielle pour la ciliogénèse en régulant le trafic entre le Golgi et les cils primaires (181, 185). Deuxièmement, OCRL1 se lie à IPIP27A qui régulerait le trafic entre les endosomes et les cils primaires (181, 185).

Contrairement à la migration cellulaire, la surexpression d'INPP5b dans les cellules oculaires de souris est capable de compenser pour la perte d'OCRL1 et de restaurer une taille et un nombre normal de cils (186).

Ces résultats suggèrent que la compensation entre INPP5b et OCRL1 n'est que partielle et dépendrait de la fonction cellulaire et du tissu affecté.

#### **1.3.2.3.2.5. Phagocytose**

Les premières évidences qu'OCRL1 joue un rôle important lors de la phagocytose ont été démontrées chez *Dictyostelium discoideum* (134, 187). Une fonction équivalente a par la suite été décrite chez les mammifères (134, 188, 189). Ainsi, OCRL1 est recrutée au niveau des phagosomes afin d'hydrolyser le PI(4,5)P2 et de remodeler le cytosquelette d'actine (189, 190). Des travaux ont mis en évidence que les mutations d'OCRL1 bloquent la fermeture des phagosomes (134, 187). Ce rôle d'OCRL1 est important pour les bactéries invasives telles qu'*Yersinia pseudotuberculosis* ou *listeria monocytogenes* (134). Ces deux bactéries ont la capacité d'envahir les cellules hôtes par l'intermédiaire de la phagocytose (191, 192). Durant ce processus, le recrutement d'OCRL1 au niveau des phagosomes permet l'hydrolyse du PI(4,5)P2, la dépolymérisation d'actine et la fermeture de l'inclusion bactérienne (191, 192).

#### **1.3.2.3.2.6. Cytocinèse**

L'expression de deux protéines partiellement redondantes Inpp5b et OCRL1 et l'existence de deux isoformes (OCRL1a et b) rend l'étude fonctionnelle de ce gène compliquée chez les eucaryotes supérieurs (134, 193). Chez la drosophile, il n'existe qu'un seul orthologue pour OCRL1 : CG3573 ou *drosophila* OCRL (dOCRL) (193, 194). Cette simplicité au niveau du génome, associée aux puissants outils génétiques et ARNi disponibles chez cet organisme, nous ont poussé à utiliser les cellules S2 de drosophiles afin de caractériser la fonction de OCRL dans la division cellulaire. Nos travaux présentés dans le chapitre 3, sont les premiers à démontrer le rôle de dOCRL dans la division cellulaire (194). Brièvement, nous avons observé que lorsque dOCRL est déplétée dans les cellules S2, le PI(4,5)P2 s'accumule sur les endomembranes. Cette accumulation ectopique recrute la machinerie du sillon de clivage au niveau des vacuoles et cause l'échec de la cytocinèse. Quelques jours après la publication de notre article, le laboratoire du Dr Arnaud Echard à Paris a confirmé nos résultats chez l'humain en montrant que des cellules déplétées pour OCRL1 ou des cellules de PSL présentent, elles aussi, des défauts de cytocinèse (54). Dans cet article, Dambournet *et al* montrent qu'OCRL1 est un effecteur de la petite GTPase Rab35 active (54). La liaison à Rab35 permet la localisation d'OCRL1 au niveau du pont intercellulaire en fin de cytocinèse (54). Lorsque OCRL1 est déplétée (ou dans les cellules de PSL) une accumulation de PI(4,5)P2 au niveau du pont intracellulaire entraîne une polymérisation atypique de l'actine (54). Cette dernière retarde considérablement l'abscission des deux cellules filles(54). Il est intéressant de noter, que la déplétion de Rab35 phénocopie la perte d'OCRL1 (54).

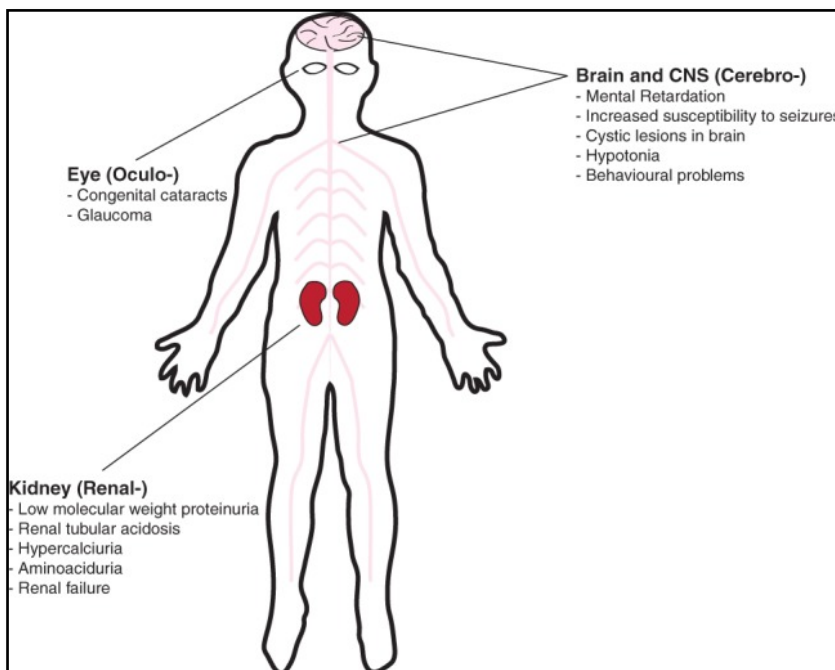
Bien que montrant des phénotypes moins dramatiques que ceux que nous avons observés dans les cellules S2, ces travaux confirment l'existence d'un rôle d'OCRL1 dans la division cellulaire. L'absence, chez la drosophile, de la redondance fonctionnelle observée entre OCRL1 et INPP5b pourrait expliquer la raison pour laquelle les phénotypes sont plus drastiques dans les cellules S2 de drosophile.

#### **1.3.2.3.3. Le Syndrome de Lowe**

Le syndrome de Lowe (SL) est une maladie génétique rare avec une prévalence dans la population générale d'approximativement 1/500.000 (195). Cette maladie fût décrite pour la première fois par le docteur Charles U. Lowe en 1952 (196). Dans cet article, le docteur

Charles U Lowe et ses collaborateurs rapportent le cas de trois patients avec une combinaison unique de symptômes qui sont : un dysfonctionnement rénal, une malformation osseuse, un retard mental et une cataracte congénitale (195, 196). En 1965, des chercheurs ont démontré que le SL est une maladie génétique à transmission récessive liée au chromosome X (197) .

Selon ce mode de transmission, la mère qui est porteuse saine transmet à son fils le chromosome X muté et il sera ainsi atteint du SL. Dans des cas extrêmement rares, le SL est observé chez des sujets féminins ayant un père sain. Ce schéma de transmission non canonique est dû à une inactivation du chromosome X sain (198) ou à une translocation chromosomique entre les chromosomes X et le chromosome 3 (199) ou le chromosome 20 (200). Ces sujets féminins ont permis de déterminer que les mutations responsables du SL sont localisées dans la région chromosomique Xq25-Xq26 (195, 199, 200). Par la suite, les travaux de Nussbaum et ses collaborateurs ont permis de déterminer le locus, d'identifier les mutations et de cloner le gène *Occulo-Cerebro-Renal syndrome de Lowe (OCRL)* (134, 195, 201, 202). Les recherches récentes ont permis d'identifier plus de 200 mutations différentes, causant le SL, toutes ces mutations affectent le gène *OCRL* (198, 203-225). Les patients atteints par le Syndrome de Lowe (PSL) présentent des signes cliniques qui varient d'un patient à un autre, mais sont caractérisés par trois manifestations principales : oculaire, cérébrale et rénale (Figure 1.21)



**Figure 1.21 :** Schématisation des principaux organes touchés par le Syndrome de Lowe [adaptée de (134)].

-Atteintes oculaires : Une dense cataracte est présente dès la naissance causée par des défauts de migration de l'épithélium du cristallin embryonnaire (195, 226) et la dégénération des fibres primaires du cristallin (136, 226). Dans 50% des cas, un glaucome sévère nécessitant une intervention chirurgicale se développe dans la première année de vie (136, 195, 227). De plus, des lésions de la cornée et du strabisme peuvent aggraver l'acuité visuelle des patients.

-Atteintes cérébrales : Elles sont à la fois au niveau du système nerveux central (SNC) et périphérique (136).

1-Une sévère hypotonie, originaire du SNC (136), est présente à la naissance avec une absence des réflexes tendineux profonds (136, 195). Cette hypotonie peut être associée à des dystrophies musculaires (228) qui causent d'importants retards dans le développement moteur (136).

2- Les PSL ont un déficit intellectuel sévère avec un quotient intellectuel médian entre 40 et 54 (136).

3- 50% des PSL souffrent de crises d'épilepsie fréquentes (136).

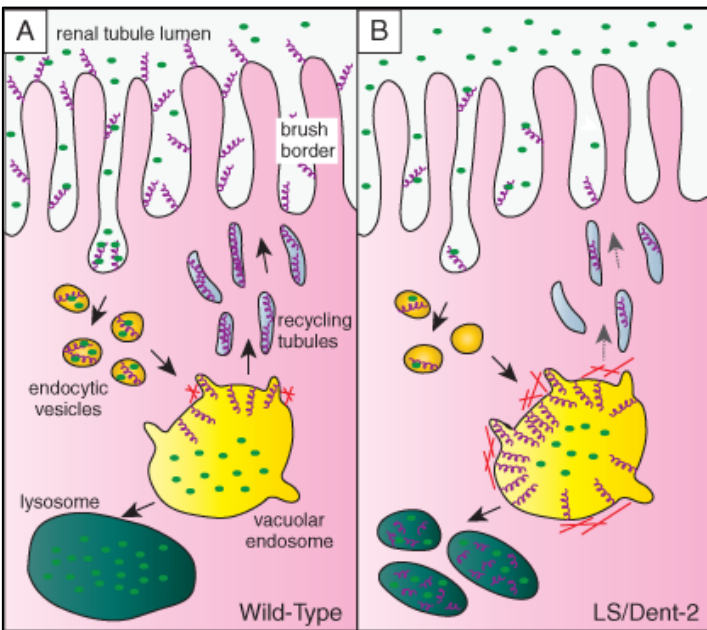
4- les PSL présentent des troubles comportementaux caractéristiques. Plus de 80% des PSL montrent des troubles obsessionnels compulsifs, des crises de colère, de l'irritabilité, de l'auto et hétéro- agressivité (136, 195).

5-L'imagerie par résonance magnétique du cerveau montre une malformation de la matière blanche pouvant être expliquée par l'accumulation du PI(4,5)P2 (229).

-Atteintes rénales: Les phénotypes rénaux du SL sont caractérisés par un dysfonctionnement tubulaire proximal de type syndrome de Fanconi. (136, 195). La sévérité des manifestations rénales varie selon les PSL et s'aggrave avec l'âge pour atteindre une insuffisance rénale de stade terminal (195) vers l'âge de 30 ans (136).

1-Une protéinurie (présence de protéine dans les urines) de faible poids moléculaire est caractéristique du SL. Cette condition est due à un défaut du trafic du récepteur multiligand la megaline (231). Ce dernier est responsable de l'endocytose médiée par les récepteurs et qui permet la réabsorption des protéines qui ont échappé à l'ultrafiltration glomérulaire (230).





**Figure 1.22** : Modèle de la fonction d'OCRL1 dans le trafic endocyttaire de la megaline dans les tubules rénaux [adaptée de (134)].

Il a été montré, dans un modèle de la fonction rénale du SL chez le poisson zébré (171), que la megaline qui est exprimée à la surface de l'épithélium des tubes contournés proximaux (chez l'humain) et dans les tubules pronéphriques (chez le poisson

zébré) se retrouve réduite dans la lumière tubulaire et s'accumule dans les compartiments endosomaux (171). Cette dérégulation des compartiments endosomaux est causée par l'accumulation de PI(4,5)P2(171) (Figure 1.22).

2- Une aminoacidurie (présence d'acide aminé dans les urines) généralisée est observée chez 80% des PSL.

3- Une enzymurie lysosomale (présence d'enzyme lysosomal dans l'urine) causée par la dérégulation du trafic vésiculaire et la fusion ectopique des lysosomes avec la membrane apicale des cellules du tubule proximal (136). Causant ainsi, une augmentation de la concentration des enzymes lysosomales dans la lumière du tubule proximal, exacerbant les dommages causés aux tissus rénaux chez les PSL (136).

4- Une hypercalciurie (augmentation anormale du calcium dans les urines) est observée chez 80% des PSL et pourrait être reliée à l'effet direct d'OCRL1 sur l'absorption intestinale du calcium (136). En effet, OCRL1 inhibe l'activité des canaux calciques intestinaux TRPV6 en réduisant le niveau de PI(4,5)P2 (136, 231). Lorsque le niveau de calcium cellulaire augmente, l'hydrolyse du PI(4,5)P2 entraîne, par boucle de rétroaction, l'inactivation des canaux calciques TRPV6 (231, 232). Chez les PSL, l'accumulation du PI(4,5)P2 bloque la boucle de rétroaction qui inactive les canaux TRPV6 (231) et entraîne une hyper absorption du calcium se traduisant par une hypocalciurie (231).

5- Les autres signes cliniques rénaux sont : une acidose tubulaire proximale ; une phosphaturie entraînant un rachitisme, une ostéomalacie et des fractures ; des lithiases urinaires et néphrocalcinose et une hypokaliémie (136, 195, 227).

En plus de ces manifestations cliniques communes à tous les PSL, d'autres manifestations peuvent toucher les patients selon le degré de gravité de la maladie : des atteintes musculo-squelettiques, dentaires, sanguines, dermatologiques, nutritionnelles et du développement sexuel (136, 233).

La cause de cette maladie est due à la réduction de l'activité phosphoinositides-5-phosphatase lorsque OCRL1 est mutée ou absente et à l'accumulation intracellulaire du PI(4,5)P2. Ce qui induit un déséquilibre dans l'homéostasie des phosphoinositides (54, 136, 163, 195, 203).

À ce jour, il n'existe aucun traitement de fond pour le SL. De lourds traitements chirurgicaux et médicamenteux sont nécessaires à la survie des patients et ne traitent que les symptômes du SL. Si ces traitements prolongent leur espérance de vie, les PSL dépassent rarement les 40 ans (136).

Hypothèse de recherche :

Plusieurs éléments indiquent que le PI(4,5)P2 pourrait jouer un rôle important dans la localisation du sillon du clivage :

Premièrement, le PI(4,5)P2 est localisé au niveau de l'équateur cellulaire en anaphase (12, 59-61). Deuxièmement, plusieurs membres de la machinerie de cytokinèse, tels que l'anilline, RhoA, et Ect2 lient directement le PI(4,5)P2 (51). Troisièmement, le PI(4,5)P2 est un régulateur critique de la polymérisation de l'actine (82). Finalement, interférer avec l'enrichissement du PI(4,5)P2 au niveau du sillon de clivage bloque la cytokinèse et conduit à la binucléation des cellules (59, 60, 234).

**Toutes ces évidences, nous ont permis d'émettre l'hypothèse de recherche que l'enrichissement du PI(4,5)P2 au niveau de l'équateur cellulaire en anaphase servirait comme repère spatial pour la localisation du sillon de clivage et le recrutement de la machinerie de cytokinèse.**

Dans le chapitre deux de cette thèse, nous présentons nos travaux qui mettent en lumière une nouvelle fonction de dOCRL dans la division cellulaire. Par la suite, dans le chapitre trois, nos recherches nous ont permis de décrire une nouvelle fonction de PTEN qui pourrait représenter une potentielle avenue thérapeutique pour traiter le syndrome de Lowe.

## **Chapitre 2**

### **Article**

# **The Inositol 5-Phosphatase dOCRL Controls PI(4,5)P<sub>2</sub> Homeostasis and Is Necessary for Cytokinesis**

Article publié dans *Current Biology* 21, 1074–1079, June 21, 2011

Lors de la division cellulaire, la cellule passe d'une forme presque sphérique et non polarisée en métaphase à une forme allongée en anaphase. Afin de pouvoir fidèlement séparer l'ADN entre les deux cellules filles, le sillon de clivage, en plus d'être régulé temporellement, doit être placé entre les deux masses d'ADN sur l'axe du fuseau mitotique. Or, en métaphase, toute ligne droite passant par le centre de la cellule pourrait constituer un équateur séparant identiquement les deux cellules filles. Cependant, seul un sillon de clivage situé précisément entre les deux masses d'ADN permet d'obtenir deux cellules filles identiques. La cellule doit établir une polarité corticale qui va permettre de définir le bon positionnement du sillon de clivage. Un des potentiels marqueurs spatiaux de cette polarité est le PI(4,5)P2. En effet, le PI(4,5)P2 passe d'une localisation corticale uniforme en métaphase à un enrichissement au niveau de l'équateur entre les deux masses d'ADN. De plus, plusieurs composantes importantes du sillon de clivage lient le PI(4,5)P2, telles que l'anilline, la myosine et les septines. Finalement, perturber la production du PI(4,5)P2 interfère avec la division cellulaire.

C'est pour toutes ces raisons que nous avons émis l'hypothèse que le PI(4,5)P2 est le marqueur spatial principal pour le positionnement du sillon clivage. Afin de tester notre hypothèse nous avons décidé de dépléter toutes les enzymes régulant le cycle des phosphoinositides. Ces enzymes régulent de façon directe ou indirecte le niveau de PI(4,5)P2 dans les cellules S2 de drosophile. Parmi tous les candidats testés, la déplétion de la 5 phosphatase dOCRL montre les défauts de cytokinèse les plus importants. Dans cet article, nous avons montré que la perte de dOCRL entraîne une accumulation ectopique du PI(4,5)P2 sur des endomembranes. Cette accumulation recrute la machinerie de cytokinèse et abroge la polarité établie lors d'une division normale et entraîne ainsi, l'échec de la cytokinèse.

Cette nouvelle fonction de dOCRL est d'autant plus intéressante qu'elle pourrait permettre de mieux comprendre le rôle d'OCRL1 dans la régulation du PI(4,5)P2 et les potentielles implications de cette fonction dans le syndrome de Lowe.

## Contribution des auteurs :

Quand j'ai rejoint le laboratoire, Chantal Roubinet avait déjà terminé le mini-crible des phosphatases, Kinases et phospholipases des phosphoinositides (figure S1a et c). J'ai fait toutes autres expériences présentes dans l'article. Sara Solinet a produit l'anticorps anti-

dOCRL. J'ai travaillé sous la supervision de Sébastien Carréno et de Grégory Emery et partiellement sous la supervision de Chantal Roubinet. L'analyse des résultats a été faite par moi-même. L'article a été écrit par Sébastien Carréno, Gregory Emery et moi-même.

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

Khaled Ben El Kadhi<sup>1</sup>, Chantal Roubinet<sup>1, 3</sup>, Sara Solinet<sup>1</sup>, Grégory Emery<sup>1, 2</sup>, Sébastien Carréno<sup>1, 2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada

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

<sup>3</sup> CNRS, UMR5547, Centre de Biologie du Développement, F-31062 Toulouse, France

\*Correspondence: [sebastien.carreno@umontreal.ca](mailto:sebastien.carreno@umontreal.ca)

## 2.1 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.

## 2.2 Highlights

- ▶ dOCRL, the *Drosophila* ortholog of human OCRL1, is required for cytokinesis
- ▶ dOCRL controls organization of the endocytic compartments
- ▶ dOCRL controls PI(4,5)P2 homeostasis
- ▶ PI(4,5)P2 regulates localization of the cytokinetic machinery

## 2.3 Results and Discussion

### 2.3.1 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  $\alpha$ -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 2.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 2.1A).

The CG3573 gene encodes a protein of 850 amino acids that we named dOCRL after one of its two human homologues, OCRL1 (oculocerebrorenal syndrome of Lowe 1) (Figure 2.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  $\sim 1$  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 2.1B). 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 2.1B; Figure 2.S1D). These results demonstrate that dOCRL is necessary for cytokinesis via its inositol 5-phosphatase enzymatic activity.

### **2.3.2 dOCRL Is Associated with Endocytic Compartments**

We took advantage of the fact that dOCRL fused to GFP or mCherry was functional (Figure 2.1B) 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 2.2A). We further found that GFP-dOCRL partially colocalized with the small GTPase Rab5, a marker of early endosomes (Figure 2.2A; 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 2.2A; 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 2.2B), showing that in the absence of dOCRL, the endocytic compartments are disorganized.

### **2.3.3 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-PHPLC $\delta$  as PI(4,5)P2 biosensors (19). In control and in dOCRL knockdown cells, PI(4,5)P2 was associated with the plasma membrane (Figure 2.2C; Figure 2.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-PHPLC $\delta$  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 2.2D; Figure 2.S2B). This defect of PI(4,5)P2 homeostasis was rescued when mCherry-dOCRL was expressed in absence of endogenous dOCRL (Figure 2.2D). These results indicate that dOCRL controls PI(4,5)P2 enrichment on the plasma membrane by dephosphorylating PI(4,5)P2 on endomembranes.

### **2.3.4 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 2.3A; Movie S1; Movie 2.S2). Whereas in control cells PI(4,5)P2 was enriched at the cleavage furrow, this accumulation was deficient upon dOCRL depletion (Figure 2.3A; Figure 2.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 2.3A; Figure 2.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 2.S3C). We then assessed the dynamics of F-actin in mitotic cells stably expressing GFP-utrophin as a F-actin reporter (22) (Figure 2.3B). 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 2.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 2.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.

**2.3.5 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 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 2.4A). 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 2.4B; Movie S3; Movie 2.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 2.4B; Figure 2.S4A). myosin II was mostly cytoplasmic in interphase and was evenly distributed at the metaphase cortex and enriched at the cleavage furrow (Figure 2.4B; Figure 2.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 2.S4A and 2.S4B). Together, these results show that contractile ring components are aberrantly recruited to the PI(4,5)P<sub>2</sub>-enriched endomembranes when function of dOCRL is impaired. This further implies that dOCRL and PI(4,5)P<sub>2</sub> 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)P<sub>2</sub> is concentrated at the plasma membrane; however, the mechanisms controlling PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis remain mysterious. Our studies identify the *Drosophila* ortholog of the human inositol 5-phosphatases OCRL1 and INPP5B as essential for PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis.

We propose that in wild-type conditions, dOCRL dephosphorylates PI(4,5)P<sub>2</sub> on membranes of the endocytic compartment to reduce PI(4,5)P<sub>2</sub> intracellular levels. Depletion of dOCRL leads to a defect in PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis with a net increase of this phosphoinositide on endomembranes. During cell division, enrichment of PI(4,5)P<sub>2</sub> 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)P<sub>2</sub> 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)P<sub>2</sub> 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)P<sub>2</sub> 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)P<sub>2</sub>, 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)P<sub>2</sub> homeostasis, endocytic compartment specification, and cytokinesis may

also be relevant to understand how mutations in OCRL1 produce the phenotypic manifestation of the Lowe syndrome.

## **2.4 Supplemental Experimental Procedures**

### **2.4.1 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-TATAGGGCCCCTATGCCTGCAGACCCGCCGGGTCCC-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<sub>t</sub>-GFP-Tubby and pUAS<sub>t</sub>-mCherry-PLC $\delta$  were from Amy Kiger and pUAS<sub>t</sub>-GFPRab7 was from Marcos Gonzalez-Gaitan.

### **2.4.2 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.

### **2.4.3 Primer sequences**

dOCRL<sub>dsRNA1</sub> :

Forward : AAGTGCTTTGAGGGCTACACC

Reverse : ACGTGCAGGATGAGAATATCG

dOCRL<sub>dsRNA2</sub> :

Forward : TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGGACATTGTCAAGGAGCGC

Reverse : TAATACGACTCACTATAGGGAGAATCGCGTAGATATCCGGCGGC

dOCRL dsRNA 5'UTR :

Forward : TAATACGACTCACTATAGGGGATTGCCAATAATTGTCATCGC

Reverse : TAATACGACTCACTATAGGGGATTCTGAGTACTGATAGGG

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 µg 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 µg dsRNA.

#### **2.4.4 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).

#### **2.4.5 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 a-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.

## **2.5 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).

## **2.6 References**

- 1 C. Janetopoulos, P. Devreotes Phosphoinositide signaling plays a key role in cytokinesis *J. Cell Biol.*, 174 (2006), pp. 485–490
- 2 S.J. Field, N. Madson, M.L. Kerr, K.A. Galbraith, C.E. Kennedy, M. Tahiliani, A. Wilkins, L.C. Cantley PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> functions at the cleavage furrow during cytokinesis *Curr. Biol.*, 15 (2005), pp. 1407–1412
- 3 R. Wong, I. Hadjiyanni, H.C. Wei, G. Polevoy, R. McBride, K.P. Sem, J.A. Brill PIP<sub>2</sub> hydrolysis and calcium release are required for cytokinesis in *Drosophila* spermatocytes *Curr. Biol.*, 15 (2005), pp. 1401–1406

- 4 K. Emoto, H. Inadome, Y. Kanaho, S. Narumiya, M. Umeda Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis *J. Biol. Chem.*, 280 (2005), pp. 37901–37907
- 5 S. Carreno, I. Kouranti, E.S. Glusman, M.T. Fuller, A. Echard, F. Payre Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells *J. Cell Biol.*, 180 (2008), pp. 739–746
- 6 F. Chen, V. Archambault, A. Kar, P. Lio', P.P. D'Avino, R. Sinka, K. Lilley, E.D. Laue, P. Deak, L. Capalbo, D.M. Glover Multiple protein phosphatases are required for mitosis in *Drosophila* *Curr. Biol.*, 17 (2007), pp. 293–303
- 7 U. Lichter-Konecki, L.W. Farber, J.S. Cronin, S.F. Suchy, R.L. Nussbaum The effect of missense mutations in the RhoGAP-homology domain on *ocr11* function *Mol. Genet. Metab.*, 89 (2006), pp. 121–128
- 8 M. Lowe Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1 *Traffic*, 6 (2005), pp. 711–719
- 9 H.J. McCrea, P. De Camilli Mutations in phosphoinositide metabolizing enzymes and human disease *Physiology (Bethesda)*, 24 (2009), pp. 8–16
- 10 R. Choudhury, A. Diao, F. Zhang, E. Eisenberg, A. Saint-Pol, C. Williams, A. Konstantakopoulos, J. Lucocq, L. Johannes, C. Rabouille, et al. Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network *Mol. Biol. Cell*, 16 (2005), pp. 3467–3479
- 11 S.F. Suchy, R.L. Nussbaum The deficiency of PIP2 5-phosphatase in Lowe syndrome affects actin polymerization *Am. J. Hum. Genet.*, 71 (2002), pp. 1420–1427
- 12 X. Zhang, P.A. Hartz, E. Philip, L.C. Racusen, P.W. Majerus 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 (1998), pp. 1574–1582
- 13 D.J. Bernard, R.L. Nussbaum X-inactivation analysis of embryonic lethality in *Ocr1 wt/-; Inpp5b-/-* mice *Mamm. Genome*, 21 (2010), pp. 186–194
- 14 G. Emery, A. Hutterer, D. Berdnik, B. Mayer, F. Wirtz-Peitz, M.G. Gaitan, J.A. Knoblich Asymmetric Rab 11 endosomes regulate delta recycling and specify cell fate in the *Drosophila* nervous system *Cell*, 122 (2005), pp. 763–773



- 15 I.M. Olivos-Glander, P.A. Jänne, R.L. Nussbaum The oculocerebrorenal syndrome gene product is a 105-kD protein localized to the Golgi complex *Am. J. Hum. Genet.*, 57 (1995), pp. 817–823
- 16 H.W. Shin, M. Hayashi, S. Christoforidis, S. Lacas-Gervais, S. Hoepfner, M.R. Wenk, J. Modregger, S. Uttenweiler-Joseph, M. Wilm, A. Nystuen, et al. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway *J. Cell Biol.*, 170 (2005), pp. 607–618
- 17 A. Ungewickell, M.E. Ward, E. Ungewickell, P.W. Majerus The inositol polyphosphate 5-phosphatase Ocr1 associates with endosomes that are partially coated with clathrin *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (2004), pp. 13501–13506
- 18 A.C. Schmid, H.M. Wise, C.A. Mitchell, R. Nussbaum, R. Woscholski Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation *FEBS Lett.*, 576 (2004), pp. 9–13
- 19 Z. Szentpetery, A. Balla, Y.J. Kim, M.A. Lemmon, T. Balla Live cell imaging with protein domains capable of recognizing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; a comparative study *BMC Cell Biol.*, 10 (2009), p. 67
- 20 J.A. Brill, G.R. Hime, M. Scharer-Schuksz, M.T. Fuller A phospholipid kinase regulates actin organization and intercellular bridge formation during germline cytokinesis *Development*, 127 (2000), pp. 3855–3864
- 21 J. Saarikangas, H. Zhao, P. Lappalainen Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides *Physiol. Rev.*, 90 (2010), pp. 259–289
- 22 B.M. Burkel, G. von Dassow, W.M. Bement Versatile fluorescent probes for actin filaments based on the actin-binding domain of utrophin *Cell Motil. Cytoskeleton*, 64 (2007), pp. 822–832
- 23 K. Kishi, T. Sasaki, S. Kuroda, T. Itoh, Y. Takai Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by rho p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (rho GDI) *J. Cell Biol.*, 120 (1993), pp. 1187–1195
- 24 D.N. Drechsel, A.A. Hyman, A. Hall, M. Glotzer A requirement for Rho and Cdc42 during cytokinesis in *Xenopus* embryos *Curr. Biol.*, 7 (1997), pp. 12–23
- 25 S. Yoshida, S. Bartolini, D. Pellman Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis *Genes Dev.*, 23 (2009), pp. 810–823

- 26 G.R. Hickson, P.H. O'Farrell Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis *J. Cell Biol.*, 180 (2008), pp. 285–294
- 27 A. Echard, G.R. Hickson, E. Foley, P.H. O'Farrell Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen *Curr. Biol.*, 14 (2004), pp. 1685–1693
- 28 M.G. Giansanti, S. Bonaccorsi, M. Gatti The role of anillin in meiotic cytokinesis of *Drosophila* males *J. Cell Sci.*, 112 (1999), pp. 2323–2334
- 29 K. Oegema, M.S. Savoian, T.J. Mitchison, C.M. Field Functional analysis of a human homologue of the *Drosophila* actin binding protein anillin suggests a role in cytokinesis *J. Cell Biol.*, 150 (2000), pp. 539–552
- 30 G.R. Hickson, P.H. O'Farrell Anillin: A pivotal organizer of the cytokinetic machinery *Biochem. Soc. Trans.*, 36 (2008), pp. 439–441
- 31 A.J. Piekny, A.S. Maddox The myriad roles of anillin during cytokinesis *Semin. Cell Dev. Biol.*, 21 (2010), pp. 881–891
- 32 C.M. Field, B.M. Alberts Anillin, a contractile ring protein that cycles from the nucleus to the cell cortex *J. Cell Biol.*, 131 (1995), pp. 165–178
- 33 R. Albertson, J. Cao, T.S. Hsieh, W. Sullivan Vesicles and actin are targeted to the cleavage furrow via furrow microtubules and the central spindle *J. Cell Biol.*, 181 (2008), pp. 777–790

## **2.7 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.

## 2.8 Figures legends

**Figure 2.1.** 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  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.2.** 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  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.3.** 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -tubulin-mCherry (red). Scale bar represents 5  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.4.** 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),  $\alpha$ -tubulin (white in merge channel), and DNA (blue). (B) Selected frames of dividing control or

dOCRL-depleted cells stably expressing anillin-mCherry (red) and Sqh-GFP (green). Scale bar represents 5  $\mu$ m.

**Figure 2.S1, Related to Figure 1.**

(A)  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 2.S2, Related to Figure 2.**

(A) Control or dOCRL depleted cells expressing mCherry-PHPLCd (red) as a marker of PI(4,5)P<sub>2</sub> were labelled for DNA (blue). (B) The ratio of mCherry-PHPLCd 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  $\mu$ m.

**Figure 2.S3, Related to Figure 3.**

(A and B) Divisions of control or dOCRL depleted cells stably expressing Tubby-GFP as a PI(4,5)P<sub>2</sub> 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),  $\alpha$ -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-value=3,9.10E-5). Upper panels: Selected snapshots of dividing control or dOCRL depleted cells stably expressing Utrophin-GFP (green) and  $\alpha$ -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 2.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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Tubulin (red) on the merge right panel. Frames were collected every 7 min. Time compression is 1680x.

**Movie 2. Tubby-GFP and  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Tubulin (red) on the merge right panel. Frames were collected every 4 min. Time compression is 1680x.

**Movie 3. Anillin-mCherry and MRLCsqh-GFP in Dividing Control S2 Cells Observed by Epifluorescence as Shown in Figure 4B** Anillin-mCherry (red) and MRLCsqh-GFP (green). Frames were collected every 6 min. Time compression is 2160 x.

**Movie 4. Anillin-mCherry and MRLCsqh-GFP in dOCRL-Depleted S2 Cells Observed by Epifluorescence as Shown in Figure 4B**

Anillin-mCherry (red) and MRLCsqh-GFP (green). Frames were collected every 6 min. Time compression is 2160 x.

**2.9 Figures**

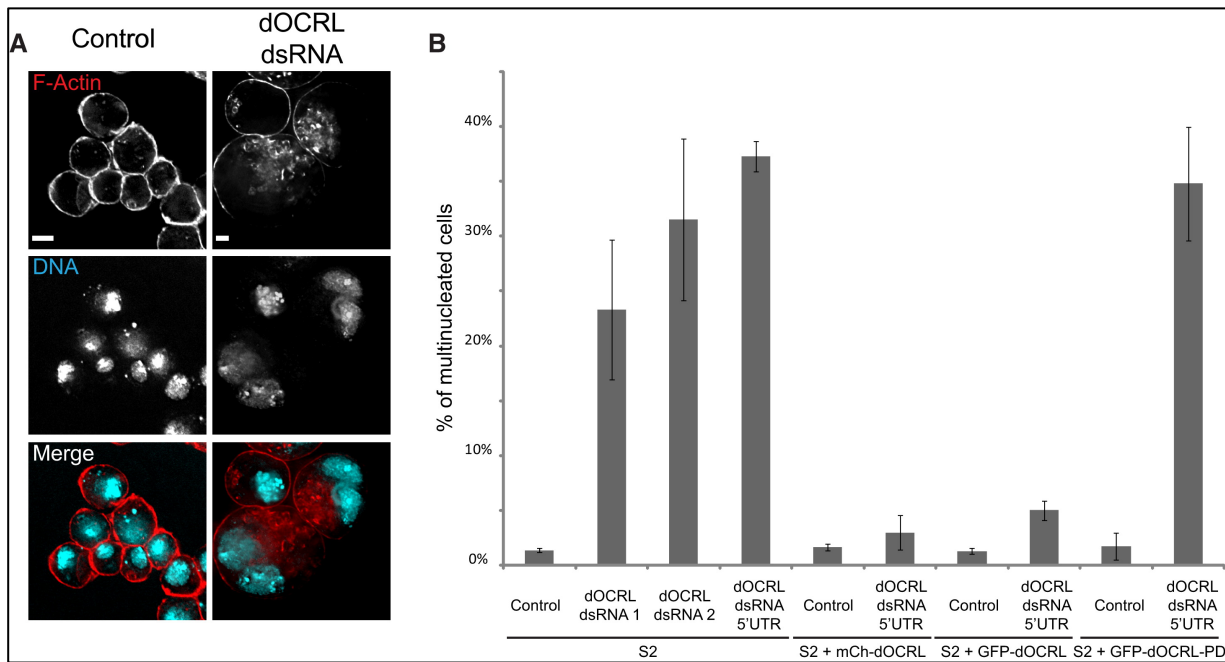


Figure 2.1 dOCRL Is Required for Cytokinesis in Drosophila S2 Cells (A) Control or dOCRL

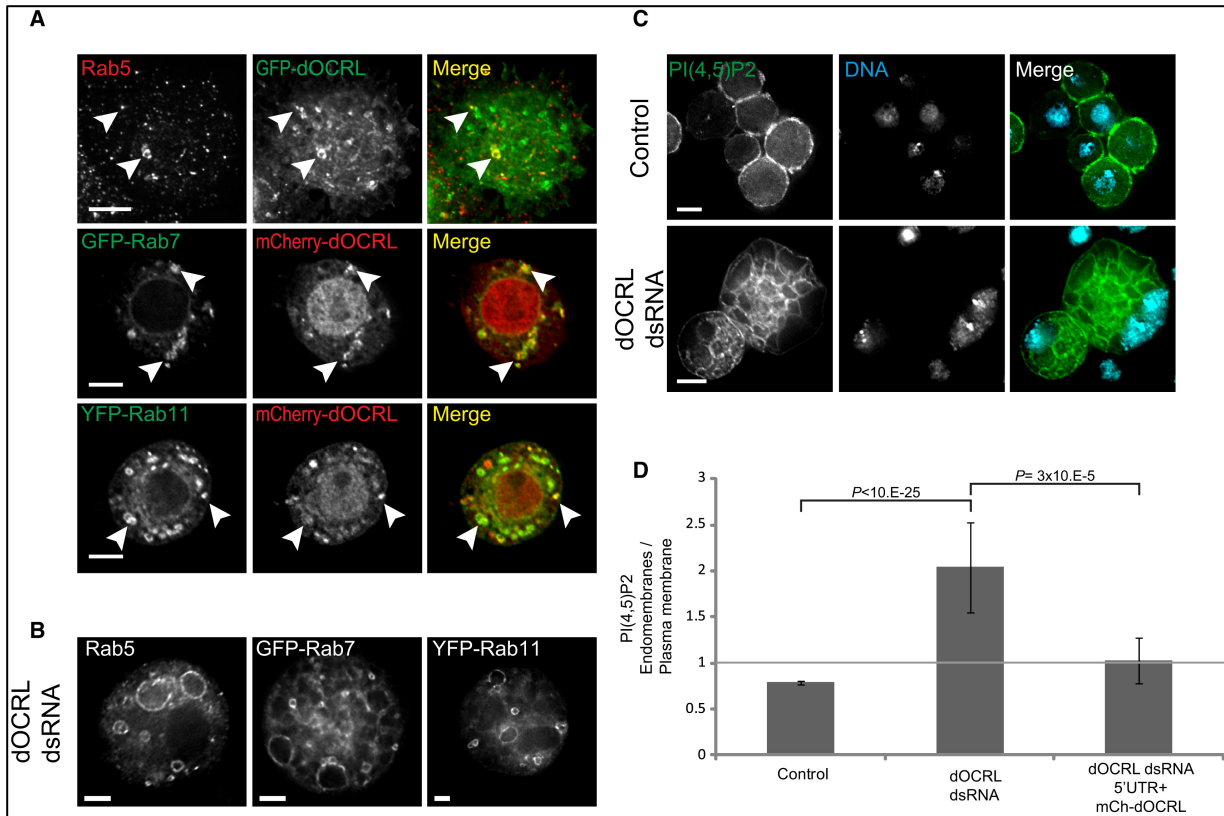
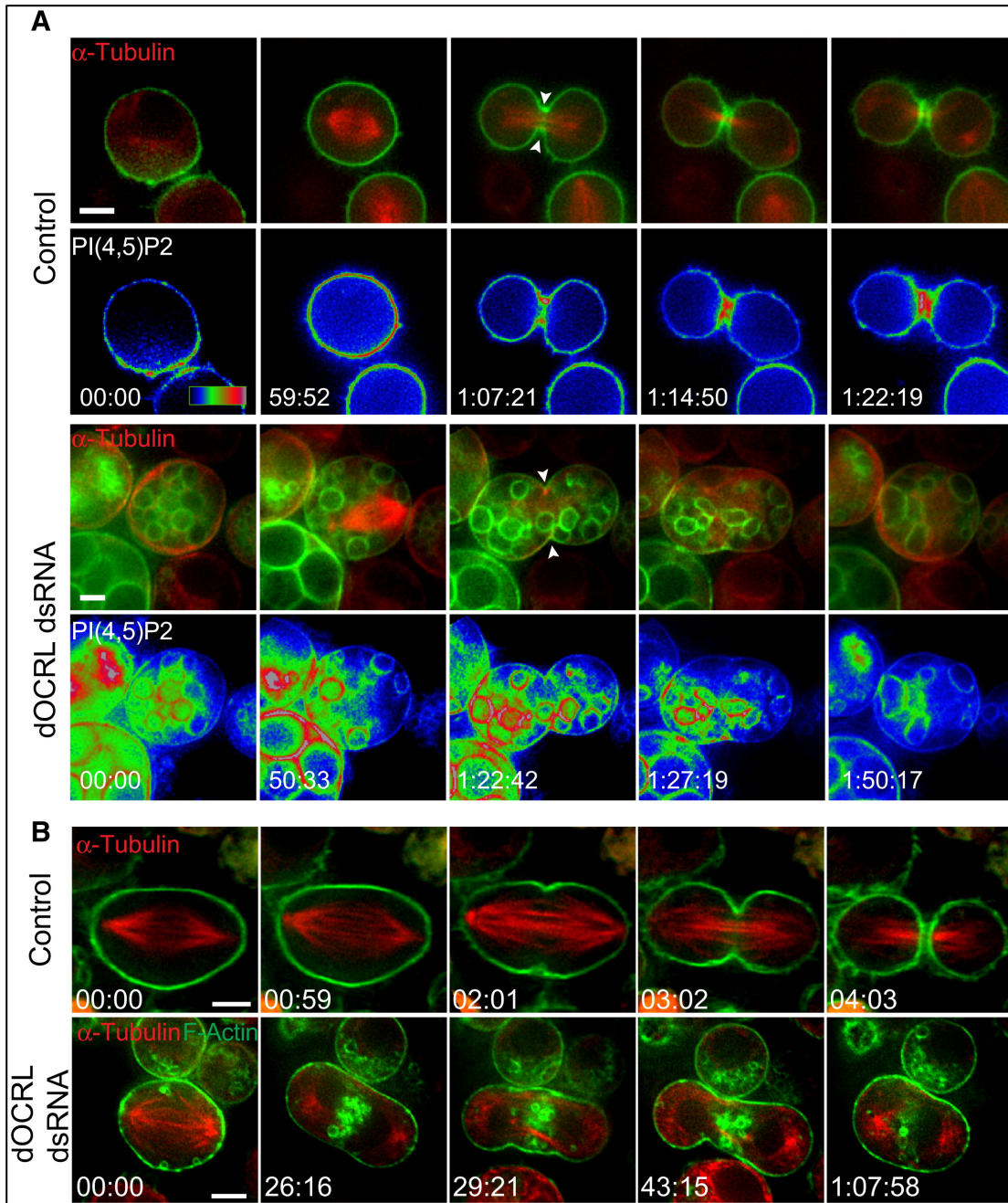
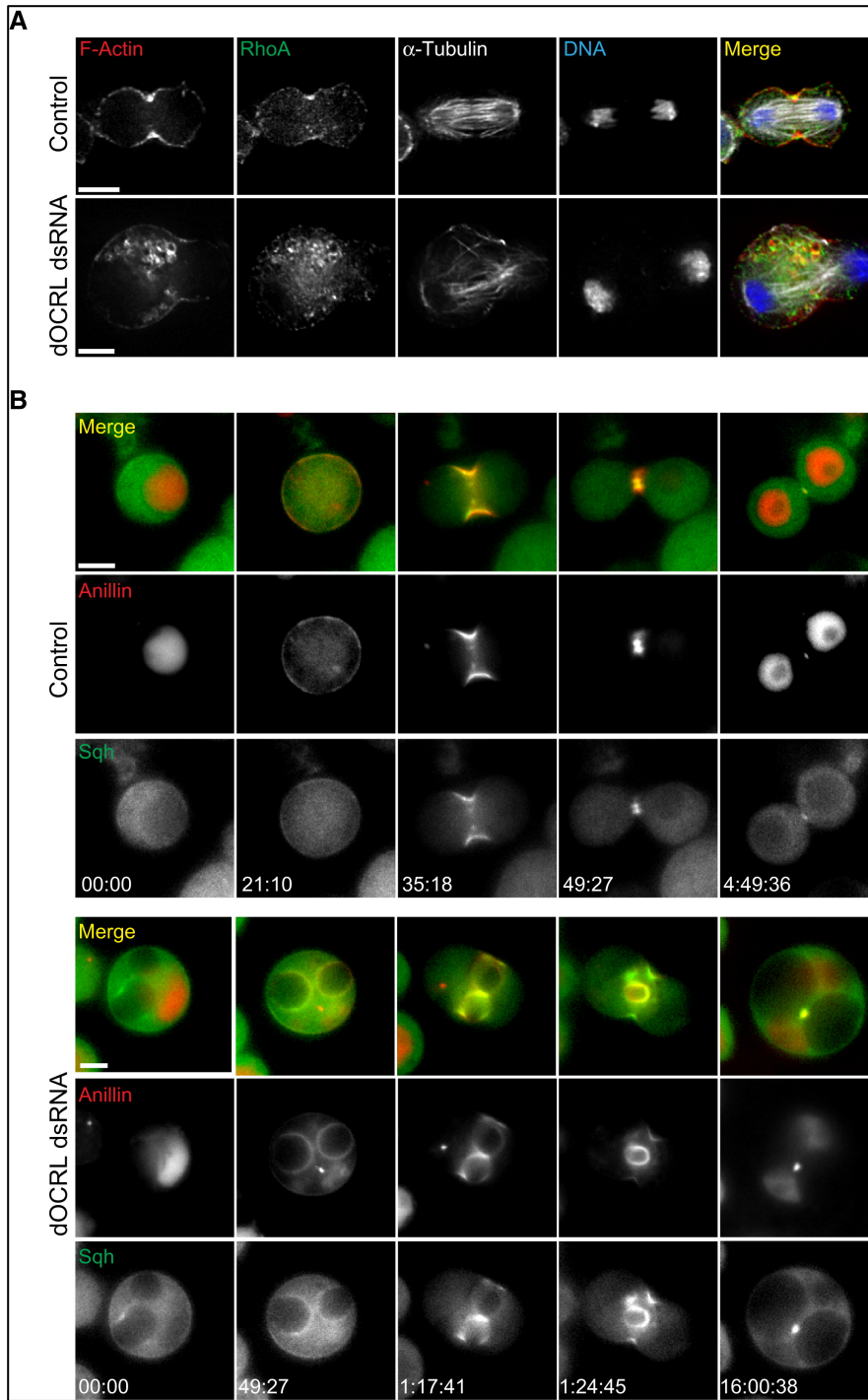


Figure 2.2 dOCRL Is Localized on Endocytic Compartments and Controls PI(4,5)P2 Homeostasis



**Figure 2.3.** dOCRL Is Required for Cleavage Furrow Positioning and Stabilization





**Figure 2.4.** dOCRL Function Is Required to Localize the Cytokinetic Ring at the Equatorial Cortex

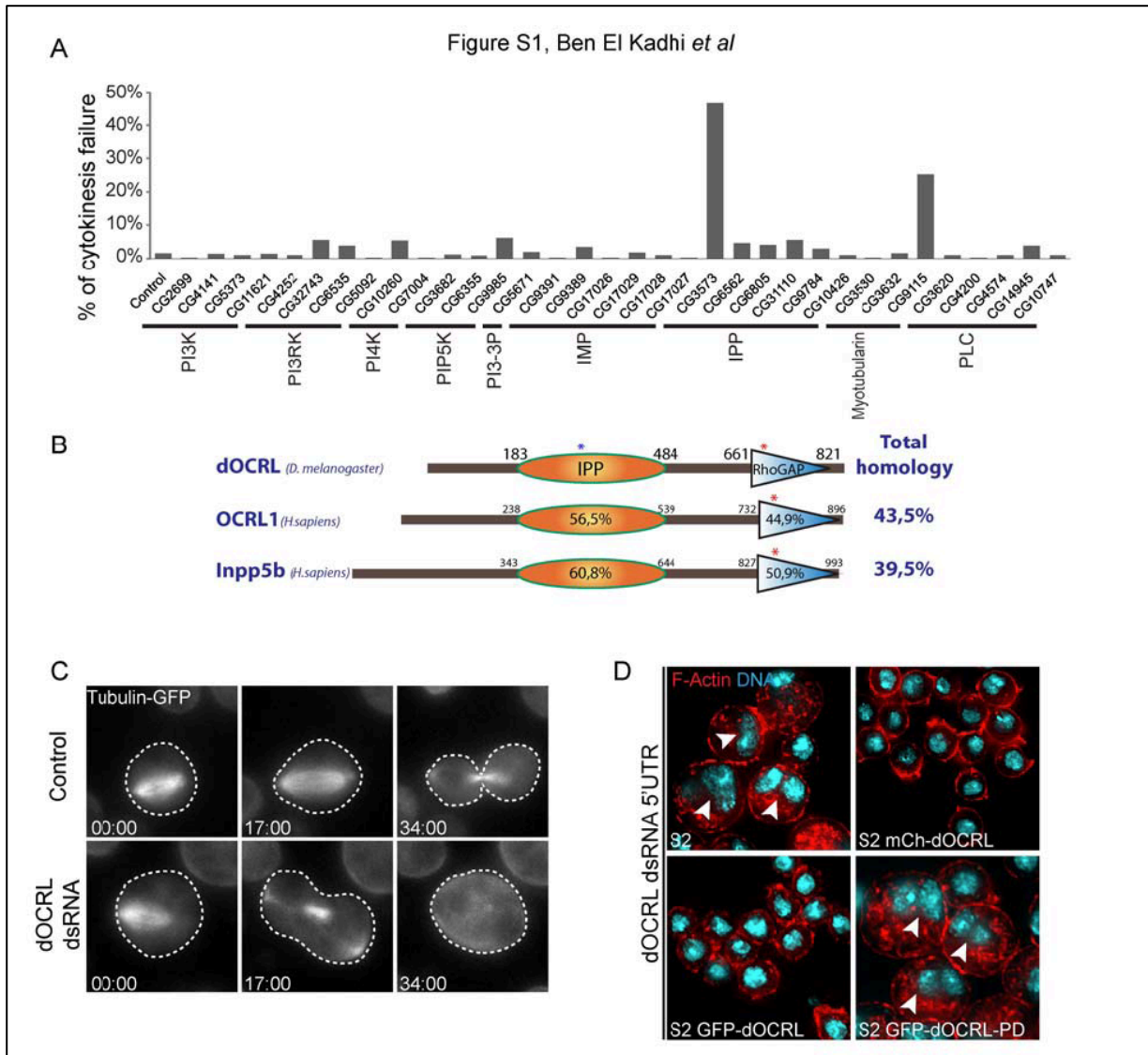


Figure 2.S1, Related to Figure 1

Figure S2, Ben El Kadhi *et al*

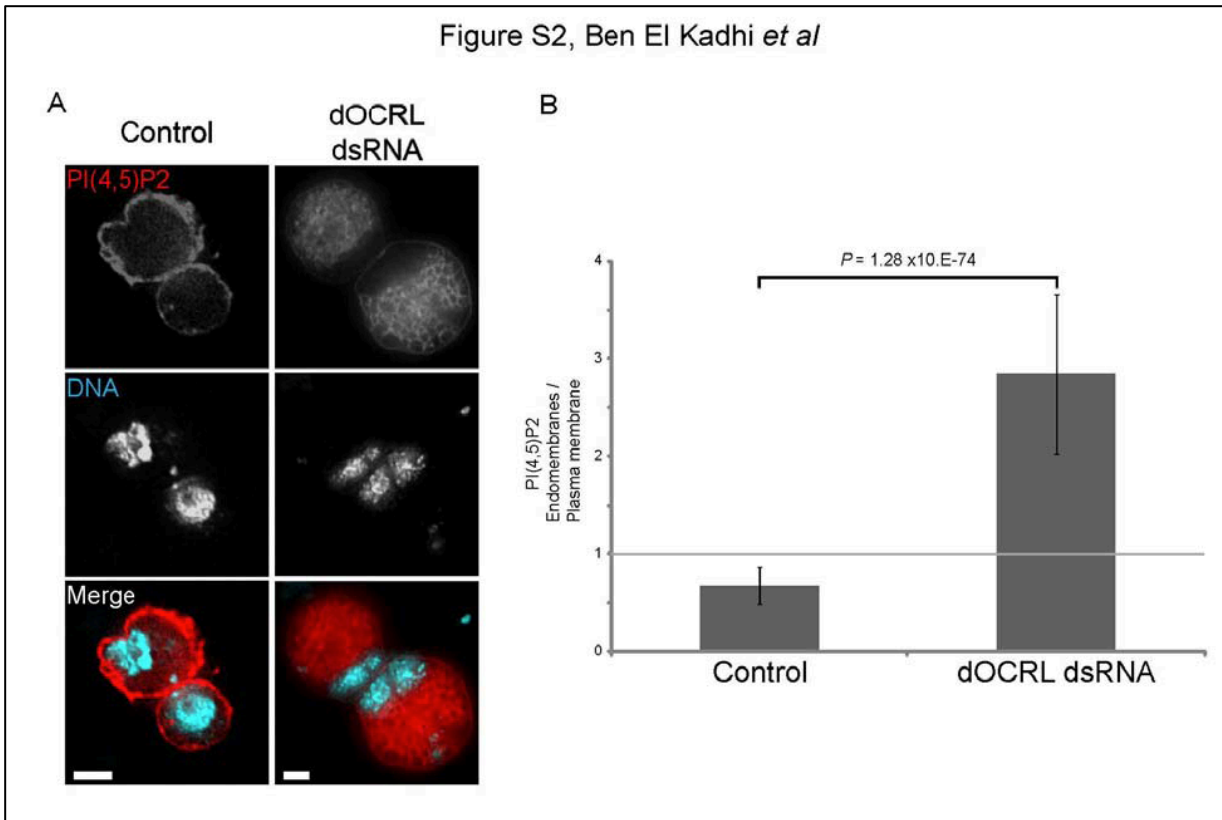


Figure 2.S2, Related to Figure 2

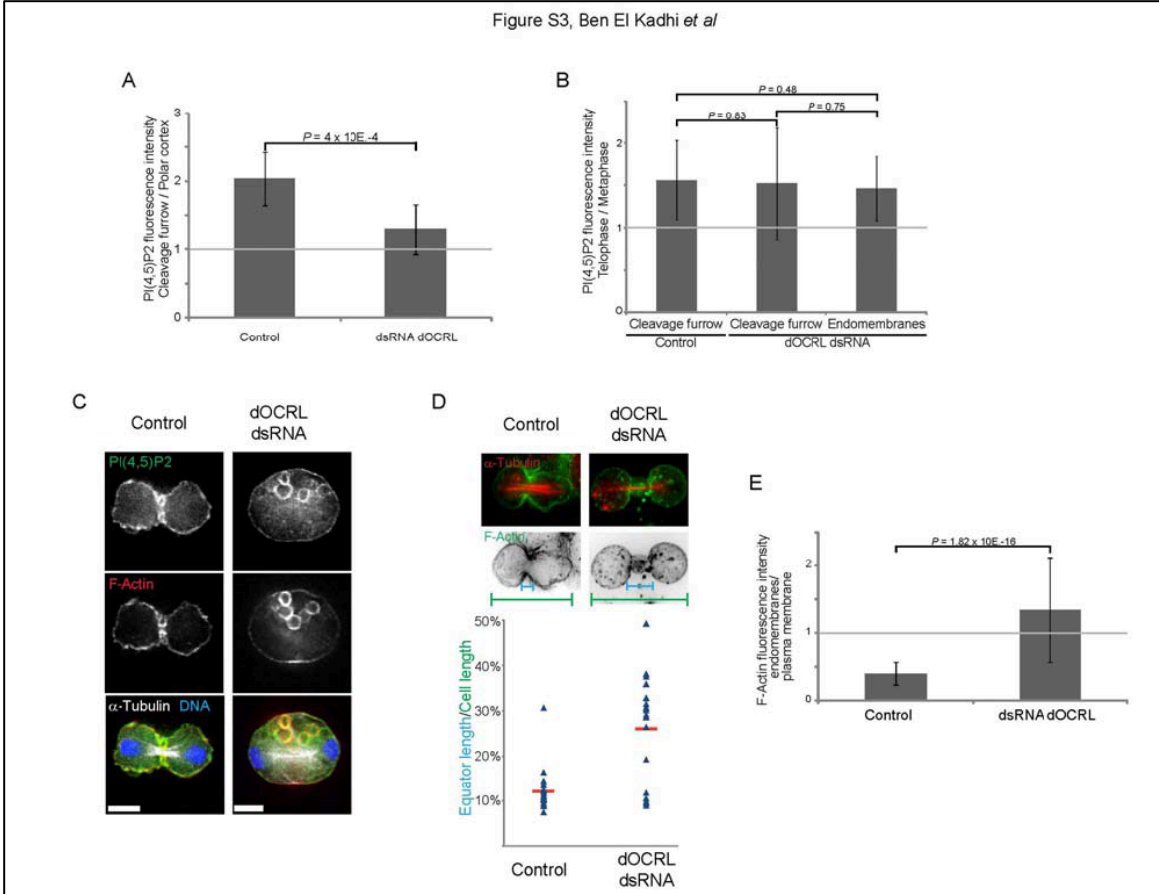


Figure 2.S3, Related to Figure 3

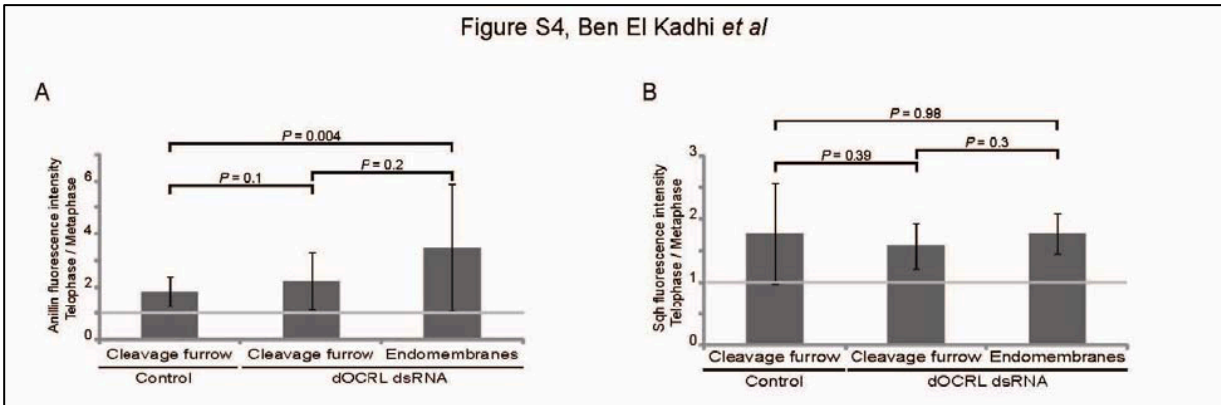


Figure 2.S4, Related to Figure 4

## **Chapitre 2.10**

### **Article Addendum**

# **The unexpected role of *Drosophila* OCRL during cytokinesis**

Publié dans *Communicative and Integrative Biology*, 2012 May 1;5(3):291-3.

# The unexpected role of *Drosophila* OCRL during cytokinesis

Khaled Ben El Kadhi,<sup>1</sup> Grégory Emery<sup>2,3</sup> and Sebastien Carreno<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Cell Biology of Mitosis laboratory; Institute for Research and Immunology and Cancer; Montréal, Québec Canada

<sup>2</sup> Vesicular trafficking and Cell Signalling laboratory; Institute for Research and Immunology and Cancer; Montréal, Québec Canada

<sup>3</sup> Département de Pathologie et de Biologie Cellulaire; Université de Montréal; Montréal, Québec Canada

**Keywords:** phosphoinositides, PI(4,5)P<sub>2</sub>, cytokinesis, cell division, OCRL1, Lowe syndrome, intracellular trafficking

## 2.10.1 Abstract

Inositides are intrinsic components of cell membranes that regulate a wide variety of cellular functions. PI(4,5)P<sub>2</sub>, one of the most abundant phosphoinositides, is restricted at the plasma membrane where it regulates numerous functions including cell division. We have recently established that the *Drosophila* inositol 5-phosphatase, dOCRL, is essential for cytokinesis, the last step of cell division (Ben El Kadhi et al. 2011) We demonstrated that dOCRL is required for the dephosphorylation of PI(4,5)P<sub>2</sub> at the surface of endosomes, resulting in the restriction of this phosphoinositide to the cell cortex during cytokinesis. dOCRL is the *Drosophila* ortholog of human OCRL1, a PI(4,5)P<sub>2</sub> phosphatase mutated in the X-linked disorder oculocerebrorenal Lowe syndrome. Here, we discuss the relevance of our findings with reference to the role of human OCRL1 in non-pathological and pathological conditions.

Phosphoinositides are intrinsic components of cell membranes that regulate a wide variety of cellular functions (1,2). The phosphoinositide family is composed of seven members that are synthesized through the phosphorylation of the 3-, 4- and/or 5-position of the inositol

ring. Phosphoinositides are produced at cellular membranes and influence a number of processes including cell survival, vesicular trafficking, cytoskeletal reorganization, cell migration and cell division. Phosphoinositides bind and regulate a plethora of proteins at the interface of the cytosol and cellular membranes. The spatial compartmentalization of phosphoinositides is regulated by the action of specific kinases, phosphatases and phospholipases. This integrated signaling network controls phosphoinositide segregation on different cellular membranes and contributes to create specialized sub-membrane domains with specific biological functions (3). For instance, during cell division, PI(4,5)P<sub>2</sub> accumulates at the cleavage furrow where it plays essential roles during cytokinesis (4-7). We have recently reported an unexpected role of the *Drosophila* PI(4,5)P<sub>2</sub> phosphatase OCRL (dOCRL) during cytokinesis (8). Importantly, mutations in the OCRL1 gene, the human ortholog of dOCRL, are the cause of the Oculocerebrorenal syndrome of Lowe (9). This rare X-linked genetic disease is characterized by mental retardation, congenital cataract and renal dysfunction. The OCRL1 gene encodes for two splice isoforms (OCRL1a and OCRL1b) that comprise a central inositol 5-phosphatase domain, a poorly characterized ASH domain and a catalytically inactive RhoGAP domain (10). In addition, OCRL1 isoforms were shown to bind with different affinity to clathrin. In vitro, the preferential substrate of OCRL1 is the phosphate at the 5- position of PI(4,5)P<sub>2</sub> (11). Impairment of the inositol 5-phosphatase activity of OCRL1 is at the basis of the molecular dysfunctions causing the Lowe syndrome (12) While the functions of OCRL1 have been subject to intense investigations, they still remain poorly understood. Difficulties in OCRL1 studies rely on the fact that cells also express INPP5B, an OCRL1 paralog that was shown to fulfill similar functions (13) *Drosophila* expresses only one OCRL ortholog, dOCRL, and we have recently demonstrated that its PI(4,5)P<sub>2</sub> phosphatase activity was important to establish (4,5)P<sub>2</sub> homeostasis, to regulate vesicular trafficking and to ensure the fidelity of cytokinesis (8)

### **2.10.2 OCRL Proteins Regulate Homeostasis of PI(4,5)P<sub>2</sub>**

Similarly to its human ortholog, dOCRL associates with the membrane of several class of endosomes (8,14). dOCRL insures that PI(4,5)P<sub>2</sub> pools are principally restricted at the plasma membrane by dephosphorylating this phosphoinositide on endomembranes. When dOCRL is knocked-down by RNAi, *Drosophila* cells in culture abnormally accumulate PI(4,5)P<sub>2</sub> at the

surface of giant endocytic vacuoles (8). Interestingly, it has been recently reported that OCRL1 also regulates PI(4,5)P2 levels on endosomes of human cells. Similarly to what we observed in *Drosophila*, HeLa cells RNAi-depleted for OCRL1, present abnormal, enlarged endosomes enriched in PI(4,5)P2 (15). Therefore, regulation of PI(4,5)P2 homeostasis and control of endosomal morphology by OCRL proteins is a general mechanism conserved across evolution. In addition, the function of OCRL proteins in the establishment of PI(4,5)P2 homeostasis is likely to participate to the underlying causes of the Lowe syndrome since cells from patient suffering from this disease have been shown to present elevated levels of PI(4,5)P2 (16).

### **2.10.3 OCRL Proteins and Vesicular Trafficking**

We established that dOCRL does not preferentially associate with one specific endosomal compartment, and is found at the surface of early, late and recycling endosomes. How dOCRL is targeted to these endosomes is not currently understood. However, two-hybrid experiments have revealed that its human ortholog, OCRL1, interacts with 16 members of the rab protein family, which regulate membrane trafficking (17). Furthermore, it has been shown that rab5 and rab6 directly stimulate the inositol 5-phosphatase activity of OCRL1 (18). Therefore, it is tempting to speculate that rab proteins regulate OCRL proteins recruitment at the surface of endosomes to control homeostasis of PI(4,5)P2. Inactivation of OCRL proteins in *Drosophila* and in human, leads to a strong disorganization of the endocytic compartments with the apparition of enlarged endosomes (8,15). In *Drosophila*, these large endocytic vacuoles appear to be the result of an unregulated fusion of early, late and recycling endosomes. The molecular explanation of this defect is still unclear but our observations suggest that the abnormal accumulation of PI(4,5)P2 on endocytic compartments, disrupt the phosphoinositide signature of each family of endosomes (19) and trigger homotypic fusion of these undefined endosomes.

### **2.10.4 OCRL Proteins and Cytokinesis**

We found that when dOCRL is depleted by dsRNA, up to 40% of *Drosophila* cells fails cytokinesis and become multinucleated (8). This cytokinesis failure is characterized by an abortive cleavage furrow that still forms but regresses rapidly and does not successively separate the two daughter cells. This phenotype is directly linked to the deregulation of



PI(4,5)P2 homeostasis: during cytokinesis, the abnormal accumulation of PI(4,5)P2 on endomembrane mis-targets essential components of the cytokinetic ring such as rhoA, actin, myosin and anillin. These components are recruited on endomembranes, at the expense of the cleavage furrow, and cannot establish a stable, efficient, cortical cytokinetic ring. These observations brought into light the essential role of PI(4,5)P2 as one of the major spatial cue that secures cleavage furrow positioning and stability during cytokinesis. The important role of dOCRL during cytokinesis appears to be conserved in human. RNAi depletion of OCRL1 in human cells delays abscission of the intercellular bridge connecting the two daughter cells after cytokinesis (20). In human cells, rab35 recruit OCRL1 at the intercellular bridge where it locally dephosphorylates PI(4,5)P2 and modifies lipid and actin composition. This remodeling of the intercellular bridge was proved to be necessary to the subsequent step of abscission. Accordingly, intercellular bridge of cells from Lowe syndrome patient show an abnormal accumulation of PI(4,5)P2 and actin that delays cell abscission. While OCRL proteins are important for cytokinesis in *Drosophila* and in mammals, their inactivation does not trigger similar cell division defects. One possible explanation is that human cells also express INPP5B that could partially substitute for OCRL1 function during cell division. Interestingly, we have found that human INPP5B could partially rescue dOCRL function during cytokinesis in *Drosophila* cells (unpublished results). These two studies have identified a novel and unexpected role of OCRL proteins during cell division (8,20). *Drosophila* which expresses only one ortholog of OCRL1 appears as a powerful and promising model to further dissect in vivo the different functions of proteins of the OCRL family.

### **2.10.5 Acknowledgments**

K.B.E.K. is a recipient of IRIC, UdeM and Canadian Institutes for Health Research scholarships. G.E. is recipient of a Tier II Canada Research Chair in Vesicular Transport and Cell Signaling. S.C. is the recipient of a Fonds de la Recherche en Santé du Québec Junior 1. This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (S.C.: MOP-89877, G.E.: MOP-114899) and from the Cancer Research Society (G.E.).

### **2.10.6 References**

1. Di Paolo G, De Camilli P. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 2006; 443:651-7; PMID:17035995; <http://dx.doi.org/10.1038/nature05185>
2. Vicinanza M, D'Angelo G, Di Campli A, De Matteis MA. Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J* 2008; 27:2457-70; PMID:18784754; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.169>
3. Kutateladze TG. Translation of the phosphoinositide code by PI effectors. *Nat Chem Biol* 2010; 6: 507-13; PMID:20559318; <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.390>
4. Emoto K, Inadome H, Kanaho Y, Narumiya S, Umeda M. Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis. *J Biol Chem* 2005; 280:37901-7; PMID:16162509; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M504282200>
5. Field SJ, Madson N, Kerr ML, Galbraith KA, Kennedy CE, Tahiliani M, et al. PtdIns(4,5)P2 functions at the cleavage furrow during cytokinesis. *Curr Biol* 2005; 15:1407-12; PMID:16085494; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.059>
6. Roubinet C, Decelle B, Chicanne G, Dorn JF, Payrastra B, Payre F, et al. Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J Cell Biol* 2011; 195:99-112; PMID: 21969469; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201106048>
7. Wong R, Hadjiyanni I, Wei HC, Polevoy G, McBride R, Sem KP, et al. PIP2 hydrolysis and calcium release are required for cytokinesis in *Drosophila* spermatocytes. *Curr Biol* 2005; 15:1401-6; PMID:16085493; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2005.06.060>
8. Ben El Kadhi K, Roubinet C, Solinet S, Emery G, Carréno S. The inositol 5-phosphatase dOCRL controls PI(4,5)P2 homeostasis and is necessary for cytokinesis. *Curr Biol* 2011; 21:1074-9; PMID:21658948; [http:// dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.030](http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2011.05.030)
9. Lowe M. Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic* 2005; 6:711-9; PMID: 16101675; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00311.x>
10. Choudhury R, Noakes CJ, McKenzie E, Kox C, Lowe M. Differential clathrin binding and subcellular localization of OCRL1 splice isoforms. *J Biol Chem* 2009; 284:9965-73; PMID:19211563; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M807442200>

11. Zhang X, Jefferson AB, Auethavekiat V, Majerus PW. The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:4853-6; PMID: 7761412; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.92.11.4853>
12. Leahey AM, Charnas LR, Nussbaum RL. Nonsense mutations in the OCRL-1 gene in patients with the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. *Hum Mol Genet* 1993; 2:461-3; PMID:8504307; <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/2.4.461>
13. Jänne PA, Suchy SF, Bernard D, MacDonald M, Crawley J, Grinberg A, et al. Functional overlap between murine Inpp5b and Ocr11 may explain why deficiency of the murine ortholog for OCRL1 does not cause Lowe syndrome in mice. *J Clin Invest* 1998; 101:2042-53; PMID:9593760; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI2414>
14. Ungewickell A, Ward ME, Ungewickell E, Majerus PW. The inositol polyphosphate 5-phosphatase Ocr1 associates with endosomes that are partially coated with clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:13501-6; PMID:15353600; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0405664101>
15. Vicinanza M, Di Campli A, Polishchuk E, Santoro M, Di Tullio G, Godi A, et al. OCRL controls trafficking through early endosomes via PtdIns4,5P<sub>2</sub>-dependent regulation of endosomal actin. *EMBO J* 2011; 30: 4970-85; PMID:21971085; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2011.354>
16. Zhang X, Hartz PA, Philip E, Racusen LC, Majerus PW. 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* 1998; 273:1574-82; PMID:9430698; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.273.3.1574>
17. Fukuda M, Kanno E, Ishibashi K, Itoh T. Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7:1031-42; PMID:18256213; <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M700569-MCP200>
18. Hyvola N, Diao A, McKenzie E, Skippen A, Cockcroft S, Lowe M. Membrane targeting and activation of the Lowe syndrome protein OCRL1 by rab GTPases. *EMBO J* 2006; 25:3750-61; PMID:16902405; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601274>

19. Behnia R, Munro S. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 2005; 438: 597-604; PMID:16319879; <http://dx.doi.org/10.1038/nature04397>
20. Dambournet D, Machicoane M, Chesneau L, Sachse M, Rocancourt M, El Marjou A, et al. Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol* 2011; 13:981-8; PMID:21706022; <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2279>

## **Chapitre 3**

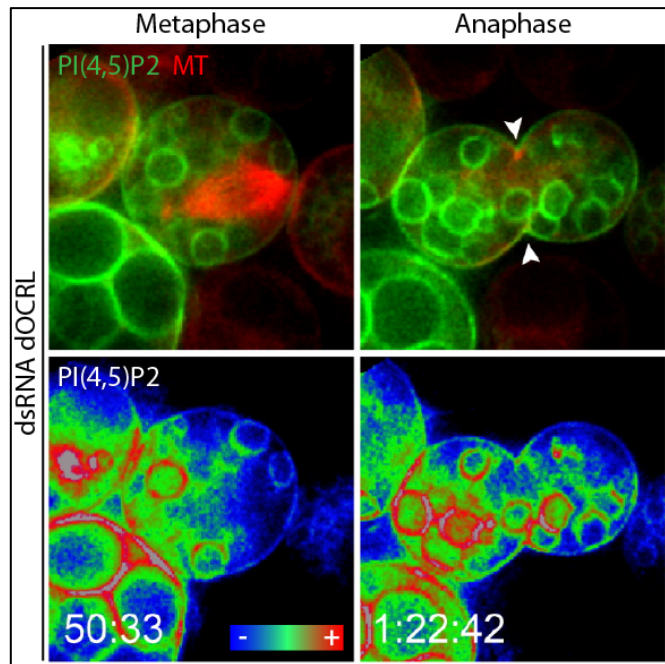
**A novel PTEN signaling pathway activates phospholipase C and rescues the cellular manifestations of Lowe syndrome.**

**Article en préparation**

### Mise en contexte :

À la suite du premier article, notre but était de caractériser la production de PI(4,5)P2 sur les endomembranes. En effet, nous avons observé que dans les cellule déplétées pour dOCRL, entre la métaphase et l'anaphase il y'avait un enrichissement de PI(4,5)P2 sur les endomembranes (figure 3.1). Dans le laboratoire, nous avons démontré que les deux protéines qui régulent majoritairement le niveau de PI(4,5)P2 chez les cellules S2 en division sont PTEN et la PI4-5 kinase Skitlles (61). Ces deux protéines localisent au niveau du sillon de clivage en anaphase (61). Nous avons alors décidé de surexprimer chacune de ces protéines dans des cellules déplétées pour dOCRL.

**Figure3.1** : Production de PI(4,5)P2 sur les endomembranes entre la métaphase et l'anaphase. [adaptée de (194)]



Nos hypothèses sont :

- 1-Skittles et/ou PTEN devraient être recrutés ectopiquement au niveau des endomembranes.
- 2-La déplétion de dOCRL associée à la surexpression de ces protéines sur les endomembranes devrait produire encore plus de PI(4,5)P2 sur les endomembranes comparativement à la déplétion de dOCRL seule.
- 3-L'augmentation de la quantité de PI(4,5)P2 sur les endomembranes devrait recruter plus la machinerie de cytokinèse sur les endomembranes et aggraver le phénotype d'échec de la division.

Nous avons observé que la surexpression de la forme GFP de Skittles se localise au niveau des endomembranes et entraîne une aggravation du phénotype de l'échec de la division cellulaire. Ceci montre que Skittles est responsable (du moins en partie) de l'enrichissement du PI(4,5)P2 au niveau des endomembranes. Nous nous attendions au même type de résultats avec la surexpression de PTEN-GFP. Étonnamment, nous avons observé que la surexpression de PTEN-GFP dans les cellules déplétées pour dOCRL1, sauve presque totalement le phénotype de binucléation. De plus, ce sauvetage est complètement indépendant de la fonction phosphatase de PTEN. Dans ce manuscrit, nous décrivons une nouvelle fonction de PTEN qui lui permet de réguler son propre produit le PI(4,5)P2 en activant de façon catalytiquement indépendante une phospholipase C. Ce travail pourrait représenter une avenue thérapeutique potentielle pour les patients atteints du syndrome de Lowe.

### **Contributions des auteurs**

J'ai réalisé toutes les expériences et les quantifications présentées dans le manuscrit excepté :

1- Le sauvetage dans les cellules HeLa et les cellules de patients atteints du Syndrome de Lowe (Fig 4 B et C). Ce travail a été réalisé par Clothilde Cauvin dans le laboratoire du Dr Arnaud Échard à Paris.

2- Le sauvetage in vivo dans le poisson zébré, réalisé dans le laboratoire du Dr. Martin Lowe à Manchester.

3- Émilie Bélanger a généré, sous ma supervision, les constructions présentées dans la figure 2A.

4- Barbara Decelles a établi les lignées cellulaires utilisées dans la figure 1C et 2D.

5- Virginie Mondin a travaillé, sous ma supervision, sur le projet et fera les révisions du manuscrit.

6- Maïssa Babouder a réalisé l'expérience présentée dans la figure S1

Le manuscrit a été écrit par : Dr Sébastien Carréno et moi même.

# **A novel PTEN signaling pathway activates phospholipase C and rescues the cellular manifestations of Lowe syndrome.**

•

Khaled Ben El Kadhi, Clotilde Cauvin, Virginie Mondin, Barbara Decelle, Émilie Bélanger, Maïssa Babouder, Arnaud Echard, Martin Lowe, Sebastien Carrèno.

## **3.1 Summary**

The tumor suppressor PTEN antagonizes the PI3K pathway by dephosphorylating PI(3,4,5)P<sub>3</sub> into PI(4,5)P<sub>2</sub>. Here we discovered that PTEN also promotes clearing of PI(4,5)P<sub>2</sub>, its own enzymatic product, by activating Phospholipase C (PLC). This novel function does not require PTEN enzymatic activity and is supported by a minimal chimera composed of its PBD and C2 domains. We show that this pathway can compensate for the loss of OCRL1, a PI(4,5)P<sub>2</sub> phosphatase whose mutation causes Oculocerebrorenal syndrome of Lowe, a rare multi-systemic genetic disease. We and others previously reported that OCRL1 inactivation impairs homeostasis of PI(4,5)P<sub>2</sub> and cytokinesis. Expression of PTEN or chemical activation of PLC enzymes rescues these defects in cellular models for Lowe syndrome. Importantly, we show that chemical activation of PLC also rescues OCRL<sup>-/-</sup> phenotypes *in vivo*, in an established zebrafish model for Lowe syndrome. As well as identifying a novel signalling pathway for control of phosphoinositide homeostasis, our findings indicate a potential new therapeutic strategy for the treatment of Lowe syndrome.



### 3.2 Introduction

Phosphoinositides are lipids that regulate a number of cellular processes including cell growth, survival, intracellular trafficking and cell morphogenesis (1,2). There are 7 different phosphoinositides obtained by phosphorylation of the 3<sup>rd</sup> and/or 4<sup>th</sup> and/or 5<sup>th</sup> position of their inositol ring. More than 100 kinases, phosphatases and phospholipases control the levels of phosphoinositides directly on membranes. However, we do not understand how these enzymes collaborate to control homeostasis of the different pools of phosphoinositides.

Deregulation of phosphoinositide levels leads to different pathologies including cancer and genetic diseases (3). For instance mutation of the polyphosphate-5-phosphatase OCRL1 is responsible for the oculocerebrorenal Lowe syndrome, a rare X-linked multisystemic orphan disease (4). Patients suffering from this syndrome present neurological defects, congenital cataracts, weak muscle tone, life threatening kidney abnormalities and have a reduced life expectancy. There is no cure for Lowe syndrome and the therapeutic treatments only alleviate some symptoms. We and others previously reported that depletion of OCRL1 impairs homeostasis of PI(4,5)P<sub>2</sub>, organization of endosomes and cytokinesis (5-12). Using a zebrafish model of Lowe syndrome, we also reported that OCRL1 inactivation triggers endocytic defects in the pronephric tubule (13). This phenotype is reminiscent of the renal tubulopathy observed in patients with Lowe syndrome (13).

We previously found that by dephosphorylating PI(4,5)P<sub>2</sub> into PI(4)P, OCRL1 plays important roles during cell division. At anaphase onset, PI(4,5)P<sub>2</sub> concentrates at the cortical equator (14-16) and recruits the cytokinetic machinery that promotes subsequent cytokinesis (6,17). As observed for OCRL1 in Human, *Drosophila* OCRL1 (dOCRL) localizes on endosomes where it reduces the levels of PI(4,5)P<sub>2</sub> (6). dOCRL dsRNA depletion promotes accumulation

of PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembrane in interphase and triggers apparition of giant endosomes. In anaphase, this abnormal intracellular accumulation of PI(4,5)P<sub>2</sub> recruits the cytokinetic machinery at the expense of the equatorial plasma membrane. As a result, furrowing and cytokinesis are defective and cells present a high rate of multi-nucleation (6). Thus, the cytokinetic defects observed upon dOCRL depletion are a secondary consequence of the deregulation of PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis on intracellular compartments. In human cells depleted for OCRL or in Lowe syndrome patient cells, PI(4,5)P<sub>2</sub> accumulation on endosomes is less pronounced (7, 12) and multinucleation is barely observed (9). Nevertheless, at the end of cytokinesis OCRL plays a role in clearing PI(4,5)P<sub>2</sub> at the plasma membrane of the intercellular bridge, which allows proper abscission of the two daughter cells (9). In OCRL1 defective cells, we showed an important delay in the duration of abscission.

Here, our initial objective was to use the Drosophila model of Lowe syndrome to understand how PI(4,5)P<sub>2</sub> is regulated on endosomes. We previously identified two enzymes important for direct production of PI(4,5)P<sub>2</sub> in Drosophila cells: Skittles, a kinase that phosphorylates PI(4)P to produce PI(4,5)P<sub>2</sub> and PTEN a tumor suppressor phosphatase that dephosphorylates PI(3,4,5)P<sub>3</sub> into PI(4,5)P<sub>2</sub> (16) . By exploring the possibility that these enzymes produce PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes, we made the unexpected discovery that overexpression of PTEN reduces PI(4,5)P<sub>2</sub> from endomembranes and rescues the cytokinetic defect of dOCRL depleted cells. We further identified a new signaling network by which PTEN promotes degradation of PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes, by activating an atypical phospholipase C (PLC). Importantly, we also found that a PLC chemical activator rescues the cytokinetic defects observed when OCRL1 is inactivated both in a Drosophila and Human cells. Finally we showed that the PLC activator can rescue OCRL1 loss *in vivo* by restoring endocytosis in the

pronephric tubule of Lowe syndrome zebrafish. We propose that chemical activation of PLC enzymes represents a new therapeutic avenue to treat patients suffering from Lowe syndrome.

### **3.3 RESULTS:**

#### **3.3.1 PTEN overexpression rescues dOCRL phenotypes independently of its phosphatase activity.**

PI(4,5)P<sub>2</sub> is mainly found at the plasma membrane where it controls several important functions. However dOCRL depletion promotes an increase of PI(4,5)P<sub>2</sub> levels on endosomes, indicating that OCRL normally limits PI(4,5)P<sub>2</sub> levels (6,12). Also suggesting that this phosphoinositide is also actively produced on these organelles and subsequently dephosphorylated by dOCRL. We wanted to assess if the PI(4)P-kinase Skittles or the PI(3,4,5)P<sub>3</sub> phosphatase PTEN were responsible for abnormal PI(4,5)P<sub>2</sub> levels observed on the enlarged endosomes upon dOCRL depletion (6). We first expressed a GFP version of Skittles (16) and we observed that in addition to the plasma membrane this kinase was also localized on the large abnormal endomembranes of dOCRL depleted cells (Fig. 3.2A). In addition we found that overexpression of Skittles further increased the rate of multi-nucleation in dOCRL depleted cells (Fig. 3.2B), which are known to result from excess PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes (16). Consistently, levels of PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes were even more increased in dOCRL depleted cells following Skittles expression (data not shown). Conversely, depleting Skittles in addition to dOCRL, reduced the levels of PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes and thus multi-nucleation promoted by the sole depletion of dOCRL (Fig 3.S1). Of note, the expression of Skittles alone also increased PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes and led to cytokinesis failure (Data not shown), although less pronounced than when dOCRL

is also depleted. Altogether, these results suggest that a balance of Skittles and dOCRL regulates PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes and cytokinesis outcome, and that reducing PI(4,5)P<sub>2</sub> production rescues the defects observed after depletion of the PI(4,5)P<sub>2</sub> phosphatase dOCRL. PTEN was recently shown to localize on endosomes (18, 19), so we expected that its overexpression would increase PI(4,5)P<sub>2</sub> levels on endosomes and thus aggravate the cytokinetic defects observed upon dOCRL dsRNA treatment. Unexpectedly, we observed the opposite effect. PTEN overexpression reduced the level of binucleated cells in dOCRL depleted cells (Fig. 3.2A & 3.2B). To test whether this surprising and novel function of PTEN in decreasing the binucleation phenotype depends on its catalytic activity, we took advantage of a C132S point mutation in PTEN (equivalent to C124S in human) that abrogates its lipid phosphatase activity (20). Interestingly, expression of this phosphatase dead mutant (PTEN<sub>C132S</sub>) significantly reduced levels of multi-nucleation (Fig. 3.2B). Since in dOCRL depleted cells, the cytokinetic defect is secondary to the accumulation of PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes, we next tested whether PTEN<sub>C132S</sub> also restored normal PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis. We measured PI(4,5)P<sub>2</sub> changes by quantitative microscopy using a PI(4,5)P<sub>2</sub> reporter cell line we characterized previously (6). This cell line stably expresses very low levels of Tubby-GFP, a specific biosensor of PI(4,5)P<sub>2</sub>, and allows relative quantification of PI(4,5)P<sub>2</sub> on the endomembrane over the plasma membrane (6, 22). We found that overexpression of PTEN<sub>C132S</sub> restores PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis in dOCRL depleted cells by reducing its levels on endomembranes (Fig. 3.2C & 3.2D). This demonstrates that PTEN can function independently of its phosphatase activity to regulate PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes.

### **3.3.2 The PBD and C2 domains of PTEN are necessary and sufficient to rescue the effects of dOCRL depletion.**

PTEN comprises five conserved domains (Fig. 3.3A) (23): an N-terminal phosphoinositide binding domain (PBD) that binds to PI(4,5)P<sub>2</sub>, a catalytic domain, a C2 domain known to promote binding to various lipids and proteins, an auto-inhibitory C-tail domain and a C-terminal PDZ binding motif mediating protein-protein interaction. We individually deleted the PBD, the catalytic, the C2 and the C-tail/PDZ domains of PTEN and measured the ability of each mutant to prevent cytokinesis failure in dOCRL depleted cells. We observed that the catalytic domain of PTEN was dispensable to prevent cytokinesis failure confirming that the catalytic activity of PTEN is not essential (Fig. 3.3B and 3.3C). Among all constructs tested, only the mutants missing the PBD or the C2 domains could not rescue dOCRL cytokinetic defects (Fig. 3.3B, 3.3C and Fig. 3.S2). We then aimed to define a minimal construction of PTEN that can rescue dOCRL depletion. We found that expression of a minimal chimera between the PBD and C2 domains (PTEN<sub>PBD-C2</sub>) prevents cytokinesis failure in dOCRL depleted cells, while expressing the PBD or C2 domain alone is not sufficient (Fig. 3.3B and 3.3C). We finally demonstrated that expression of PTEN<sub>PBD-C2</sub> in dOCRL depleted cells rescues PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis at levels similar than control cells (Fig. 3.3D and 3.3E).

### **3.3.3 A dPLCXD hydrolyzes PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes downstream of PTEN.**

Since PTEN<sub>C132S</sub> and PTEN<sub>PBD-C2</sub> do not have any enzymatic activity we reasoned that to reduce PI(4,5)P<sub>2</sub> levels on endomembranes, PTEN might directly or indirectly activate enzymes that can lower PI(4,5)P<sub>2</sub> levels. Some of the most efficient enzymes that can hydrolyse PI(4,5)P<sub>2</sub> are enzymes of the PLC family. They cleave the phosphorylated inositol

ring of PI(4,5)P<sub>2</sub> from its diglyceride moiety. We thus tested if PTEN rescues OCRL phenotypes through activation of a PLC enzymatic activity. Having previously shown that PTEN rescued cytokinetic defects by restoring normal levels of PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes, we focused on measuring cytokinesis rescue, a phenotype that can be easily scored. To this aim, we expressed PTEN<sub>C132S</sub> or PTEN<sub>PBD-C2</sub> while inhibiting PLC enzymes using the cell-permeable U73122 PLC inhibitor (24). This inhibitor does not cause cytokinetic defects in control cells, but it prevents the rescue seen with both PTEN constructs in dOCRL depleted cells (Fig. 3.4A and 3.4B). This suggests that PTEN activates a PLC to compensate for dOCRL loss. To further confirm this finding we aimed to identify which Drosophila PLC can act as an effector of PTEN. We co-depleted 5 different PLC enzymes together with dOCRL and quantified multi-nucleation after PTEN<sub>PBD-C2</sub> expression. The individual depletion of each PLC does not cause a cytokinetic defect in normal cells (Fig. 3.S3). Among the 5 PLCs tested, only depletion of CG14945 prevents PTEN<sub>PBD-C2</sub> rescue of the cytokinetic defect triggered by dOCRL depletion (Fig. 3.4). This PLC is the Drosophila ortholog of the atypical human PLC, PLCXD (25). This potentially places dPLCXD downstream of PTEN to rescue the phenotypic consequences of dOCRL depletion. In addition our results show that while PTEN dephosphorylates PI(3,4,5)P<sub>3</sub> to produce PI(4,5)P<sub>2</sub>, it can further induce degradation of its own enzymatic product through action of a PLCXD, and this, independently of its own catalytic activity.

### **3.3.4 Defects observed upon OCRL1 depletion can be prevented by chemical activation of PLC.**

Our results suggest that the phenotypes caused by dOCRL depletion could be rescued by the activation of PLC enzymes even in absence of PTEN overexpression. We decided to investigate this possibility in two different cellular models of Lowe syndrome (Drosophila and Human) and in a recently-developed *in vivo* model (zebrafish). In these three models, we compared the action of *m*-3M3FBS, a chemical activator of PLC with those of *o*-3M3FBS, its inactive analog (26). In Drosophila cells, we found that while *m*-3M3FBS did not perturb cytokinesis in control cells, it prevented cytokinesis failure in dOCRL depleted cells. *o*-3M3FBS, its inactive analog, did not modify the multi-nucleation rate of dOCRL depleted cells (Fig. 3.5A and 3.5B).

We next analyzed the consequences of *m*-3M3FBS in human cells. We previously reported that cytokinetic abscission is delayed both upon depletion of OCRL1 by RNAi in HeLa cells and in renal epithelial cells of a Lowe patient harbouring an inactive version of OCRL1 (9). Interestingly, the abscission delay observed in Lowe patient cells was fully corrected by treatment with *m*-3M3FBS. However, *m*-3M3FBS did not change the timing of abscission in normal cells (renal cells collected from a healthy donor). We confirmed in HeLa cells treated with control and OCRL siRNAs that the active compound *m*-3M3FBS restored normal abscission in OCRL-depleted cells, whereas the inactive analog *o*-3M3FBS had no effect (Fig 3.S4). We conclude that the abscission delay resulting from OCRL inactivation or depletion can be suppressed by low doses of the PLC activator *m*-3M3FBS.

Finally to test whether activation of PLC can rescue phenotypes induced by loss of OCRL1 in an *in vivo* context we used a previously established zebrafish model for Lowe syndrome (27). This model, which is deficient in OCRL1, has a renal tubular endocytosis defect which can be attributed to excessive accumulation of PI(4,5)P<sub>2</sub> (13). To determine if PLC activation can

rescue the endocytic defect in Lowe syndrome zebrafish, embryos were treated with *m*-3M3FBS or the inactive analog *o*-3M3FBS and accumulation of injected endocytic tracer was monitored in the renal tubule monitored by fluorescence microscopy (Fig. 3.5E). Remarkably, *m*-3M3FBS treatment had no effect on renal uptake in wild-type embryos, but efficiently rescued endocytosis in the renal tubule of OCRL1 mutant embryos (Fig. 3.5E and 3.5F). The inactive analog had no effect in either zebrafish strain. These results indicate that activation of PLC can rescue loss of OCRL1 function in an *in vivo* context, namely the renal tubule, one of the major tissues affected in Lowe syndrome patients.

### 3.4 DISCUSSION

Our work identified a new signaling pathway by which PTEN activates a PLC enzyme to reduce levels of PI(4,5)P<sub>2</sub> on endomembranes. We showed that this pathway can rescue the defects associated with the loss of OCRL1 activity in *Drosophila* cells. Importantly, we also provide evidence that chemical activation of PLC, the downstream enzyme of this pathway, restores normal functions in *ex-vivo* and *in vivo* models of Lowe syndrome.

In this study we identified a moonlighting role of PTEN. We showed that in a context where PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis is impaired, expression of a catalytic inactive mutant of PTEN lowers PI(4,5)P<sub>2</sub> levels on endomembrane. While the tumor suppressor role of PTEN is attributed to its PI(3,4,5)P<sub>3</sub> phosphatase activity, an increasing number of studies has shown that PTEN could also function independently of its catalytic activity (28). We showed here that the PBD and C2 domains of PTEN are necessary and sufficient to restore PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis in OCRL1 depleted cells. We also observed that the chimera composed of these two domains localizes on endomembranes (see Fig. 3.3D), the location where PI(4,5)P<sub>2</sub> levels



are decreased when PTEN is expressed. Interestingly, using super-resolution microscopy, PTEN was recently shown to associate with endosomes in human cells (18).

The PBD domain of PTEN is known to allow binding to PI(4,5)P<sub>2</sub> and its C2 domain is also involved in lipid binding. C2 domains are found in more than 100 proteins and were also shown to mediate protein-protein interaction (29). For instance the C2 domain of synaptotagmins is responsible of the binding of these proteins to syntaxins (30). By epistasis experiments we showed that dPLCXD, an atypical PLC, is necessary for the rescue and thus, could act downstream of PTEN . This still poorly characterized PLC was shown to have a *bona fide* PLC hydrolysis activity towards PI(4,5)P<sub>2</sub> (25). In addition, as for PTEN and PTEN<sub>PBD-C2</sub>, the human ortholog of dPLCXD also localizes on endosomes indicating a potential functional cooperation between these two enzymes. In this study we explored the role of this new PTEN-PLCXD signaling pathway in a pathological context where OCRL1 is depleted. We are currently working on the hypothesis that this new signaling axis could also control PI(4,5)P<sub>2</sub> levels on endosomes in a normal context. Tight control of PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis is crucial for several important functions such as cell growth, division and migration. A better understanding of this PTEN-PLCXD pathway will thus have several important repercussions on how we envision the role of PTEN as a tumor suppressor.

The Lowe syndrome is a very rare and devastating genetic disease. To date there is no cure and all medical efforts are limited to treating the multiple clinical manifestations of the syndrome. Here we showed that chemical activation of PLC enzymes can restore several functions impaired in different models for Lowe syndrome: PLC chemical activation did not only restore normal cytokinesis in *Drosophila* and Human cells lines RNAi depleted for OCRL1 but it also rescued this function in renal cells from a patient suffering from Lowe

syndrome. In addition we showed that PLC chemical activation restored renal tubule endocytosis *in vivo*, a dysfunction involved in the renal failure of Lowe patients. *m*-3M3FBS, the PLC chemical activator used in our study, has been already used in a mouse animal model without any sign of toxicity (31). Therefore using *m*-3M3FBS to activate PLC could represent a new therapeutic strategy to treat Lowe syndrome patients.

### 3.5 Materials and method

#### 3.5.1 DNA Constructs

PTEN-GFP and SKTL-GFP were obtained as previously described. PTEN<sub>C132S</sub>-mCherry, PTEN<sub>C132S</sub>-GFP, and PTEN domain mutants were obtained by inverse PCR using high fidelity Phusion polymerase (New England Biolob) with the following primers:

PTEN<sub>C132S</sub> Forward 5' TAAAGCTGGAAAGCGCAGAACCGGTACCATGATCTGCG 3',

PTEN<sub>C132S</sub> Reverse 5' GAGTGCACGGCTACAACATTGGACGAATCTTCC 3',

PTEN-ΔPBD Forward 5' TACAAAGAAAAAGGATACGATTTGG 3',

PTEN-ΔPBD Reverse 5' CATGTTGCTGCAGAATTCCACCACACTGG 3',

PTEN-Δphosphatase Forward 5' TCTGTTCCATATTCGAAAGTAAGCC 3',

PTEN-Δphosphatase Reverse 5' TCTTCGTATACGTTTTTTACTCACTACATTGC 3',

PTEN-ΔC2 Forward 5' TCTAATTTTAGCAATGATGTTCAAGCTGAAGCG 3',

PTEN-ΔC2 Reverse 5' TCTACTTGAACAACTAGTTTGG 3',

PTEN-ΔC-Term Forward 5' TCTCCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCCACC 3',

PTEN-ΔC-Term Reverse 5' TCTCTCTGCCTCAAAAACGATTGAAATC 3',

#### 3.5.2 S2 Cell culture, dsRNA treatment, transfection and Drug treatment:

Drosophila S2 cells were grown in Schneider's Drosophila medium complemented with FBS, Penicillin and Streptomycin (Invitrogen). For dsRNA knockdown, dsRNA was produced using T7 RiboMax express large scale RNA production system (Promega). dsRNAs were amplified from plasmid or genomic DNA using the following Primers

dOCRL-Reverse

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAATCGCGTAGATATCCGGCGGC3'

dOCRL

-Forward

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGAAAGGACATTGTCAAGGAGCGC3'

CG10747-Forward 5'TAATACGACTCACTATAGGGCGCAACAGTTAAACGAACCC3'

CG10747-Reverse 5'TAATACGACTCACTATAGGGTGATTATCGACAGGTCACGC3'

CG14945-Forward

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGGAGATTATCATATTTGGACTCAAGG3'

CG14945-Reverse

5'TAATACGACTCACTATAGGGAGCTCTGGGGTCAGCTCCGCCATATCGG3'

CCG3620-Forward

5'TAATACGACTCACTATAGGGAAAACTGAAGCCTTGGA AAAA3'

CG3620-Reverse 5'TAATACGACTCACTATAGGGCGAGTATGGGAAATTCTCGG3'

CG4200-Forward 5'TAATACGACTCACTATAGGGTTGTGCGTGAGATTGATTCAG3'

CG4200-Reverse 5'TAATACGACTCACTATAGGGATGCCATTAATTGATGCC3'

CG4574-Forward 5'TAATACGACTCACTATAGGGGCCTGCCGGGAGTACACTT3'

CG4574-Reverse 5'TAATACGACTCACTATAGGGGCAGCTGGTGCATAACCTCT3'

For functional experiments, cells were cultured in 96 well plates (Greiner) for 6 days. Cells were treated with 3.5 µg of dsRNA at day 0 and at day 3. 36 hours before fixation cells were transfected with the indicated cDNA using Fugene HD (Promega). For PLC inhibition experiments, cells were treated with 40 µM of U-73122, 24 hours before fixation (Calbiochem). For PLC activation experiments, cells were treated with 50 µM *m*-3M3FBS (Tocris) or its inactive analog *o*-3M3FBS (Tocris) 24 hours before fixation.

### **3.5.3 Immunofluorescence :**

Cells were fixed using Paraformaldehyde 4% (Alfa Aesar) for 20 minutes. Coverslips were then washed using TBS. Cells were permeabilized using TBS-Saponin-BSA for 60 minutes. Actin was stained using 1/100 Texas-Red-X-Phalloidin (Molecular Probe) or 1/50 Alexa Fluor 647 Phalloidin (Molecular Probe). Coverslips were mounted using Vectashield with Dapi (Vector Lab).

PI(4,2)P<sub>2</sub> ratio quantification was described previously. Briefly, a stable cell line expressing Tubby-GFP was fixed and permeabilized. An anti GFP antibody (Molecular Probe) and a secondary Alexa 488 conjugated antibody (Molecular Probe) was used to stain GFP. Images were acquired using a DeltaVision elite microscope (GE) with a 60x planApo Olympus objective and a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics). To assess multinucleation, at least 500 cells were counted per condition per experiment. Images were treated using SoftWorx software (GE), ImageJ software (NIH) and Photoshop and Illustrator (Adobe).

### **3.5.4 Abscission assays in Human cells**

The Lowe patient and normal renal cell lines have been established and characterized in reference (9), after informed consent was obtained from the patient and his parents, in

accordance with French law. HeLa cells were grown in DMEM medium (Gibco BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM glutamine. Lowe cells and control cells were grown in DMEM/F12 (GIBCO BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum, ITS supplemented, 4pg/mL triiodothyronine, 36ng/ml dexamethasone, 10ng/ml EGF, 100 U/ml penicillin/streptomycin and 2 mM glutamine at 33°C. For silencing experiments, HeLa cells were transfected with the corresponding siRNA once using HiPerFect (Qiagen) following the manufacturer's instructions. siRNAs were transfected for 72h before imaging. For time-lapse phase contrast microscopy: Transfected cells were plated on 35 mm glass dishes (Iwaki) and put in an open chamber (Life imaging) equilibrated in 5% CO<sub>2</sub> and maintained at 37°C. Time-lapse sequences were recorded at 10 min for 60 hr on a Nikon Eclipse Ti Inverted Microscope with a 20x0.45NA plan fluor ELWD objective lens controlled by the Metamorph 6.1 software (Universal Imaging). This microscope was equipped with a cooled CCD camera (HQ2; Roper Scientific). *m*-3M3FBS (Tocris) or its inactive analog *o*-3M3FBS (Tocris) diluted in DMSO have been added at 25 μM during time-lapse recording.

### **3.5.5 Zebrafish strains and husbandry**

Zebrafish were maintained in standard conditions (Westerfield, 2000) at the University of Manchester Biological Services Unit according to the UK Animals Act 1986. The *ocr1<sup>-/-</sup>* mutant line (ZDB-GENO-120531-1) has been described previously (Ramirez *et al* 2012). Wild type fish were of AB background.

Lysine-fixable 10 kDa dextran labelled with Alexa 488 (Molecular Probes) was prepared in PBS at 2 μg/μl final concentration. Zebrafish embryos at 72 hpf (hours post fertilisation) were treated for 60 minutes with DMSO control (0.005% DMSO), 5 μM *m*-3m3fbs or 5 μM *o*-3m3fbs by addition to the water. Embryos were then anaesthetised with 0.2 mg/ml MS222 (Sigma) in chorion water, and tracer injected into the common cardinal vein using a glass micropipette PLI-90 Pico-Injector (Harvard Apparatus). Embryos were returned to the respective drug treatments and incubated at 29°C. Pronephric accumulation was assessed 2 hours after injection on whole mount embryos using a fluorescent dissecting stereomicroscope (Leica MZ10F). Statistical analysis was performed using the Pearson's chi-squared test with Prism software (Prism Software Corporation)

### 3.6 Figures legend:

#### 3.6.1 Figure 3.2 PTEN overexpression prevents cytokinesis and PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis defects in dOCRL depleted cells, independently of its enzymatic activity.

**A.** 4,5 days after the beginning of dOCRL dsRNA treatment, cells were transfected by the indicated GFP tagged constructs. After 2 more days of dOCRL dsRNA treatment and transgenes expression, cells were labelled for F-actin (red) and DNA (blue). Asterisks indicates binucleated cells **B.** The histogram represents the percentage of multinucleated cells quantified following the indicated treatments. A minimum of 500 cells were counted per condition. A 3 experiments were performed **C.** Cells stably expressing low levels of the PI(4,5)P<sub>2</sub> biosensor, Tubby-GFP, were treated (2 bottom rows) with dOCRL dsRNA. After 4,5 days of dsRNA treatment, cells were transfected with PTEN<sub>C132S</sub>-mCherry (bottom row). After 2 more days cells were labelled for DNA (blue) and Tubby-GFP was revealed using an anti-GFP antibody (green). A minimum of 50 cells were quantified per condition **D.** The ratio of Tubby-GFP fluorescence associated with endosomes to that associated with the plasma membrane was measured using image J on fixed cells (minimum of 3 independent experiments, error bar represents SD). ns, non-significant; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; \*\*\*\*, P < 0.0001 (Student t-test). Bar 10 mm.

#### 3.6.2 Figure 3.3 A chimera between PTEN<sub>PBD</sub> and PTEN<sub>C2</sub> is sufficient to rescue dOCRL

**dsRNA defects. A.** A schematic depicting the five domains of PTEN and the PTEN constructs used in this study. **B.** dOCRL dsRNA depleted cells were transfected after 4,5 days of dsRNA treatment and fixed after 48 hours of expression of the indicated GFP tagged PTEN constructs. Cells were labelled for F-actin (red) and DNA (blue). Asterisks indicates binucleated cells **C.** The histogram represents the percentage of multinucleated cells quantified following the

indicated treatments. Each P-values were calculated against the dOCRL dsRNA condition. A minimum of 500 cells were counted per condition. A 3 experiments were performed **D**. Cells stably expressing low levels of the PI(4,5)P<sub>2</sub> biosensor, Tubby-GFP, were treated with dOCRL dsRNA. After 4 days of dsRNA treatment, cells were transfected with PTEN<sub>PBD-C2</sub>-mCherry. After 2 more days cells were labelled for DNA (blue) and Tubby-GFP was revealed using an anti-GFP antibody (green). **E**. The ratio of Tubby-GFP fluorescence associated with endosomes to that associated with the plasma membrane was measured using image J on fixed cells (minimum of 3 independent experiments, error bar represents SD). ns, non-significant; \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001; \*\*\*\*, P < 0.0001 (Student t-test). Bar 10 μm.

**3.6.3 Figure 3.4 PTEN rescues dOCRL loss through dPLCXD function.** **A**. Control cells (top row) or dOCRL dsRNA treated cells (2 bottom rows) were transfected by the PTEN<sub>C132S</sub>-GFP (middle row) or PTEN<sub>PBD-C2</sub> (bottom row) after 4 days of dsRNA treatment. Cells were concomitantly treated by 40μm of the PLC inhibitor U-73122. Cells were fixed after 48 hours of expression of the transgenes and labelled for F-Actin (red) and DNA (blue). Asterisks indicates binucleated cells **B**. The histogram represents the percentage of multinucleated cells quantified following the indicated treatments (a minimum of 500 cells were counted per condition) **C**. Cells were concomitantly treated with dOCRL dsRNA and the indicated dsRNA targeting the different Drosophila PLCs. After 4,5 days, cells were transfected (dark blue bars) or not (light blue bars) with PTEN<sub>PBD-C2</sub> to allow dOCRL rescue. Cells were fixed after 48 hours and labelled for F-Actin and DNA. The histogram represents the percentage of multinucleated cells quantified following the indicated treatments. Only depletion of dPLCXD (CG14945) prevents rescue of dOCRL loss by PTEN<sub>PBD-C2</sub>. Each P-values were calculated

against non-treated cells. ns, non-significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  (Student t-test). Bar 10  $\mu\text{m}$ . (n=3, 500 cells minimum per condition).

#### **3.6.4 Figure 3.5 Chemical activation of PLC rescues OCRL phenotypes in Drosophila,**

**Lowe syndrome patient cells and a zebrafish Lowe syndrome model. A.** Control cells (left panel) or dOCRL dsRNA treated cells (2 right panels) were treated for 48 hours with the PLC activator m-3M3FBS or its inactive analog o-3M3FBS. Cells were fixed and labelled for F-Actin (red) and DNA (blue). Asterisks indicates binucleated cells **B.** The histogram represents the percentage of multinucleated cells quantified following the indicated treatments. Each P-values were calculated against dOCRL dsRNA treated cells **C.** Normal renal epithelial cells from a donor not mutated in OCRL and renal epithelial cells from a Lowe syndrome patient were treated with the PLC activator m-3M3FBS or its inactive analog o-3M3FBS. After 1 h of treatment cell divisions were recorded by time-lapse microscopy. The curves represent the distribution of the abscission times in the indicated cell populations. **D.** Mean abscission times were measured on time-lapse movies in the normal and Lowe renal epithelial cells treated with the PLC activator m-3M3FBS or its inactive analog o-3M3FBS. **E.** Confocal images of pronephric tubules (indicated by a dashed line) in wildtype (WT) and *Ocrl*<sup>-/-</sup> zebrafish mutant embryos. The indicated embryos were injected with Alexa 488-10 kDa dextran (green) and treated with the PLC activator m-3M3FBS or its inactive analog o-3M3FBS. **F.** Pronephric accumulation in the indicated embryos was monitored by fluorescence microscopy after 2.5 h. ns, non-significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  (Student t-test).

Bar 10  $\mu\text{m}$ .

**3.6.5 Figure 3.S1 related to figure 3.2. A.** Automatic high throughput counting of binucleation using Opera microscope (Perkin Elmer). Cells were labelled for F-actin (red) and

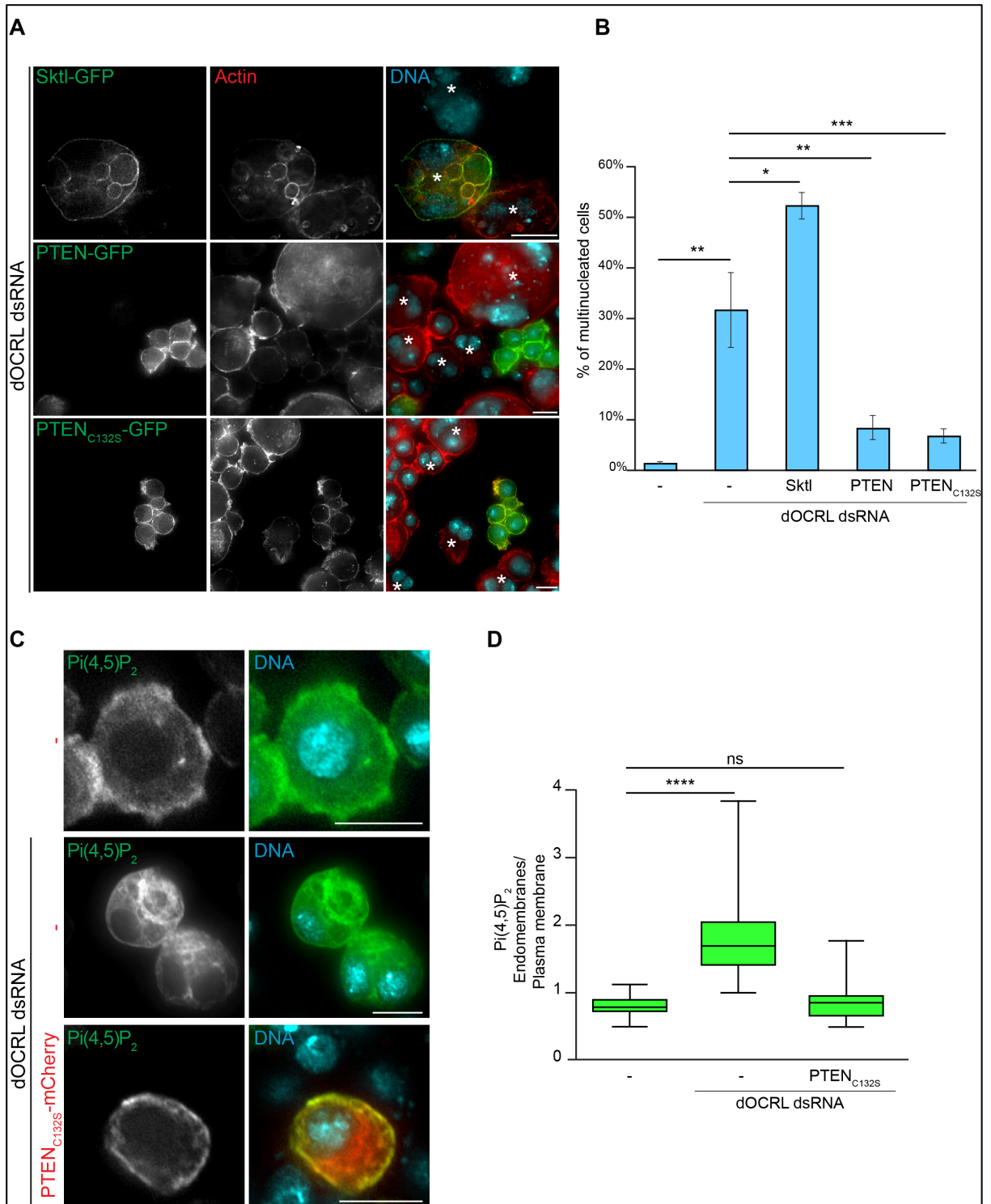


DNA (blue). B. Automatic quantification of binucleated cells using Harmony software (Perkin Elmer).

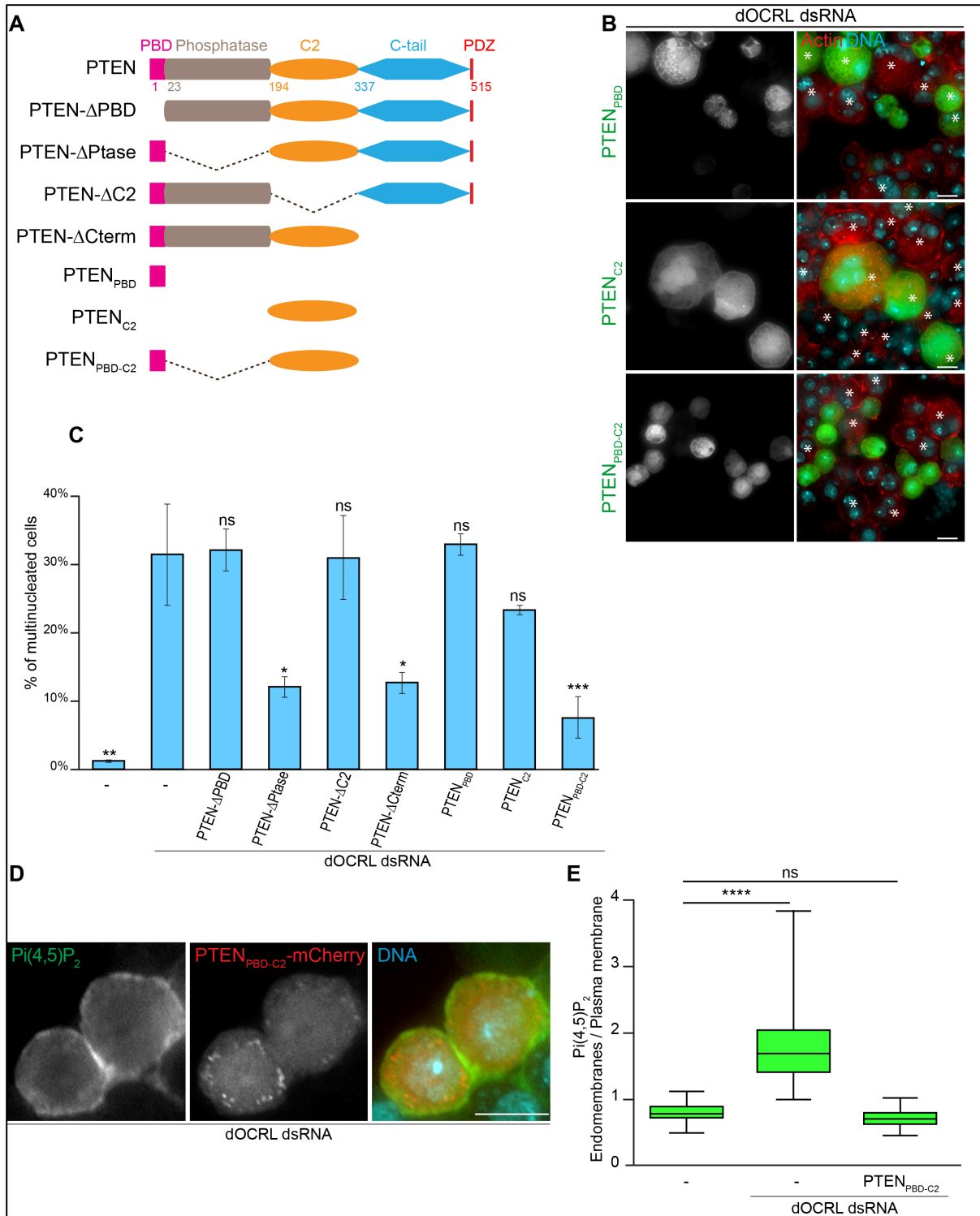
**3.6.6 Figure 3.S2 related to figure 3.3.** A dOCRL dsRNA depleted cells were transfected after 4,5 days of dsRNA treatment and fixed after 48 hours of expression of the indicated GFP tagged PTEN constructs. Cells were labelled for F-actin (red) and DNA (blue). Asterisks indicates binucleated cells.

**3.6.7 Figure 3.S3 related to figure 3.4** Cells were treated the indicated dsRNA targeting the different Drosophila PLCs. After 4,5 days, cells were transfected or not with PTEN<sub>PBD-C2</sub>. Cells were fixed after 48 hours and labelled for F-Actin and DNA. The histogram represents the percentage of multinucleated cells quantified following the indicated treatments.

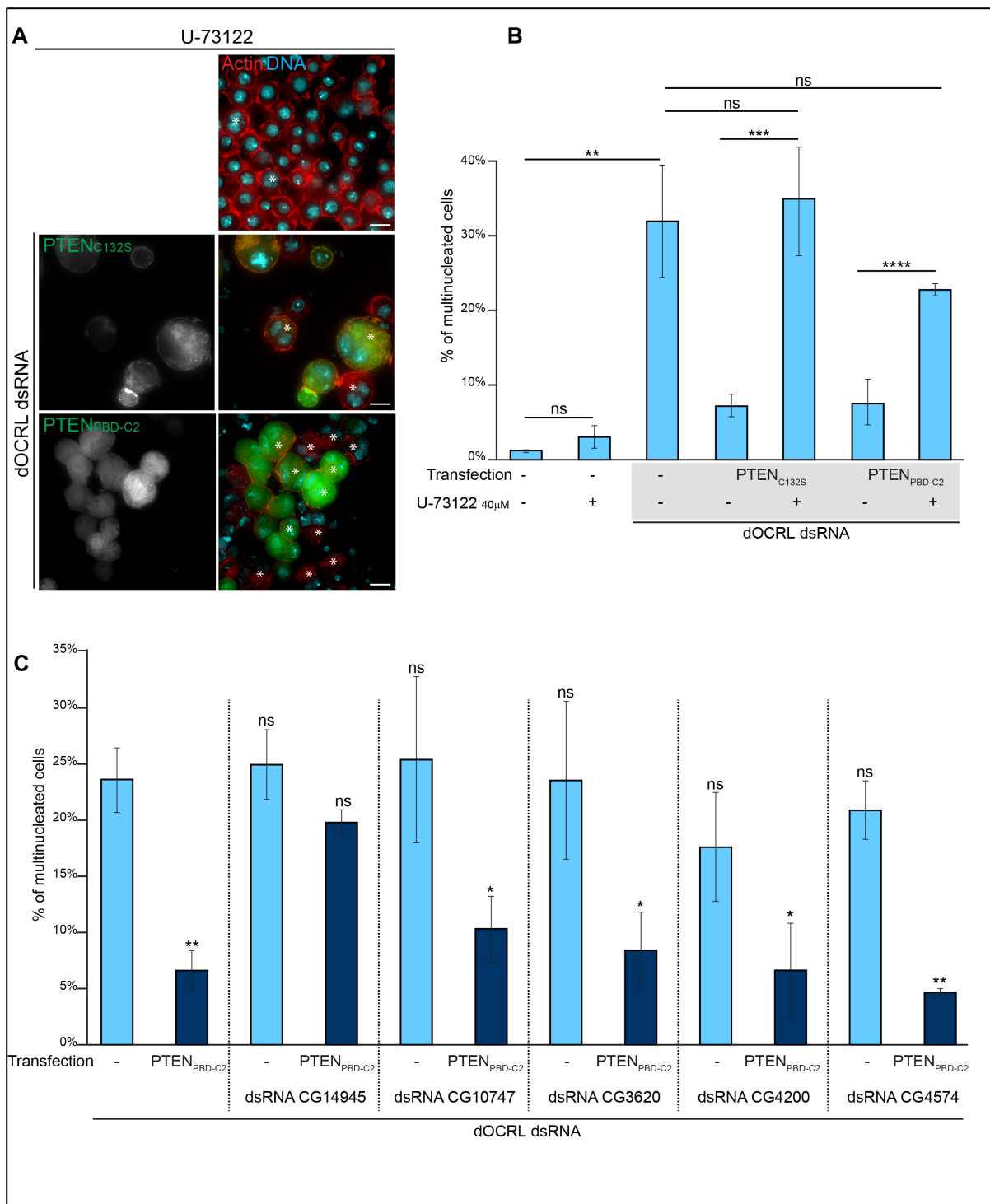
**3.6.8 Figure 3.S4 related to figure 3.5** HeLa cellstreated with OCRL RNAi or control RNAi were treated with the PLC activator m-3M3FBS or its inactive analog o-3M3FBS. After X h of treatment cell divisions were recorded by time-lapse microscopy. The curves represent the distribution of the abscission times in the indicated cell populations. **D.** Mean abscission times were measured on time-lapse movies in HeLa cells treated with the PLC activator m-3M3FBS or its inactive analog o-3M3FBS.



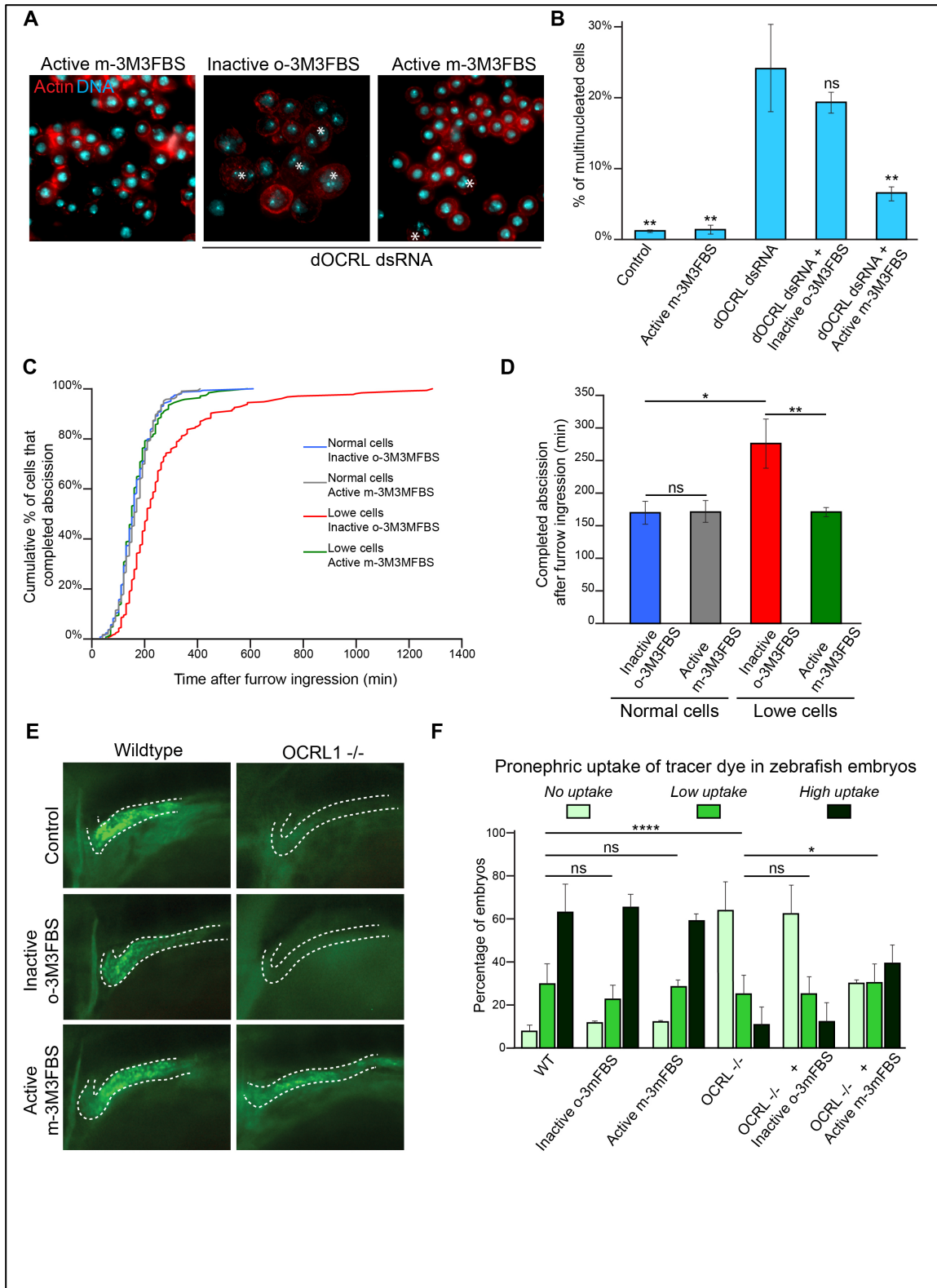
**Figure 3.2** PTEN overexpression prevents cytokinesis and PI(4,5)P<sub>2</sub> homeostasis defects in dOCRL depleted cells, independently of its enzymatic activity.



**Figure 3.3 A chimera between PTEN<sub>PBD</sub> and PTEN<sub>C2</sub> is sufficient to rescue dOCRL dsRNA defects**



**Figure 3.4 PTEN rescues dOCRL loss through dPLCXD function**



**Figure 3.5 Chemical activation of PLC rescues OCRL phenotypes in *Drosophila*, Lowe syndrome patient cells and a zebrafish Lowe syndrome model**

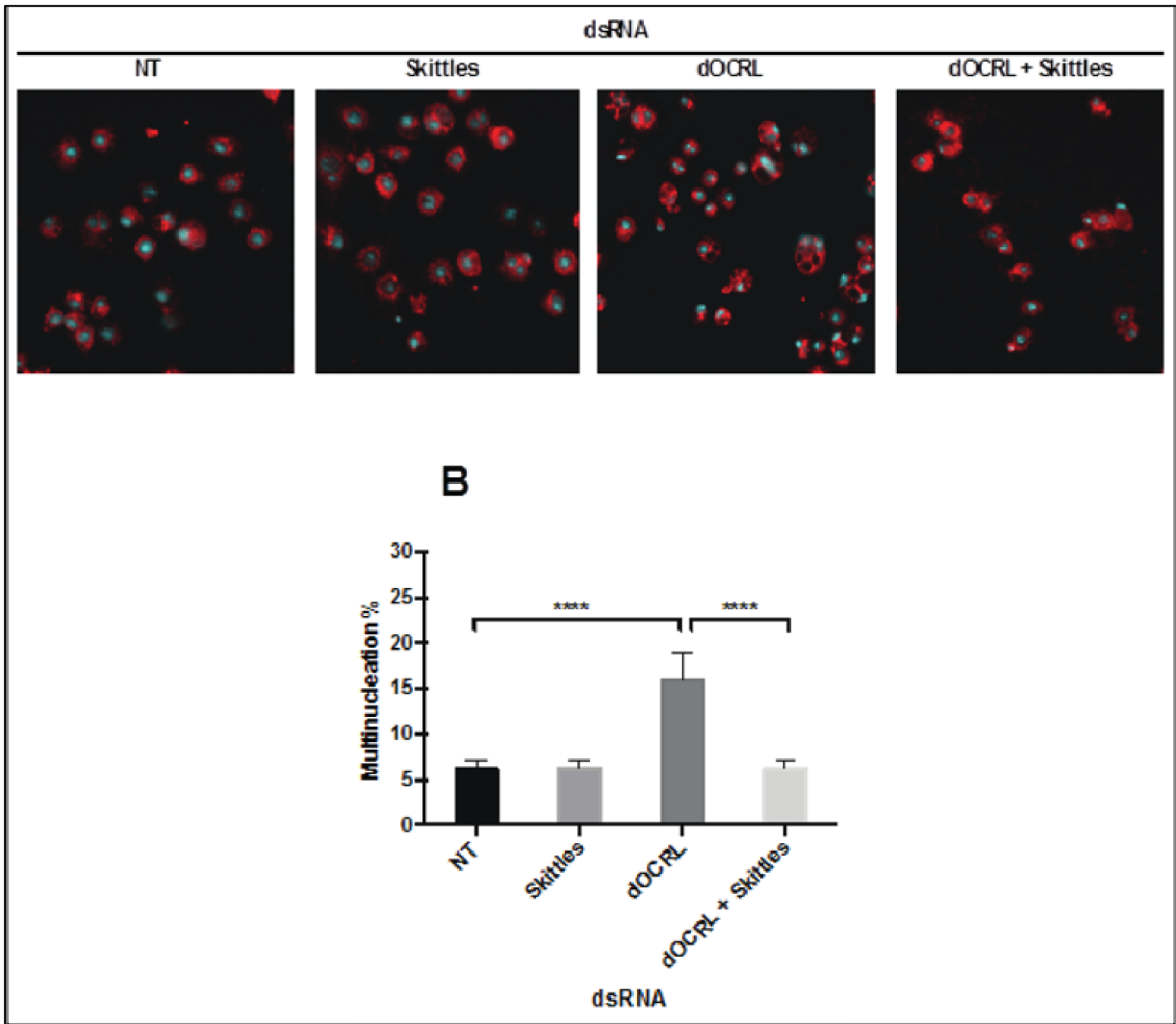


Figure 3.S1 related to figure 3.2

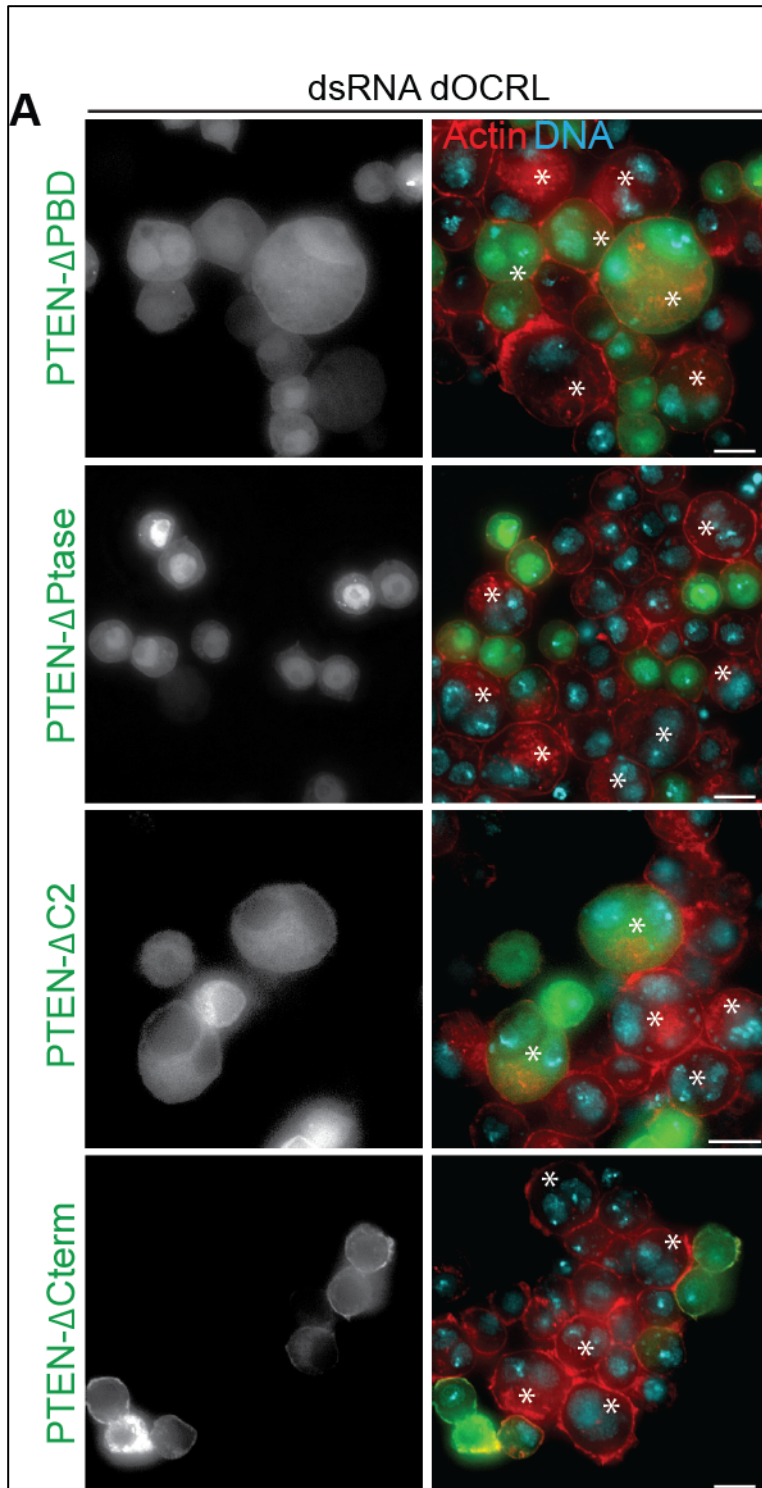


Figure 3.S2 related to figure 3.3

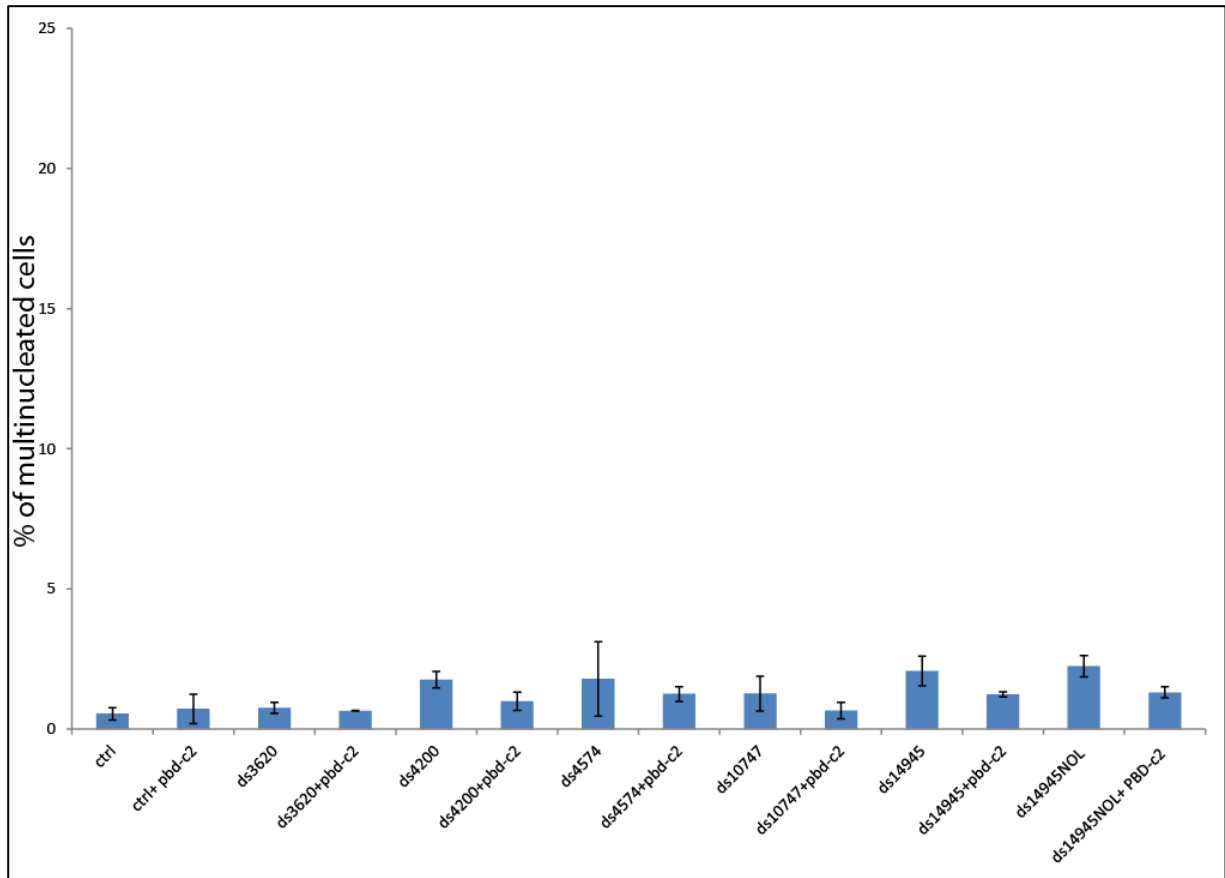


Figure 3.S3 related to figure 3.4



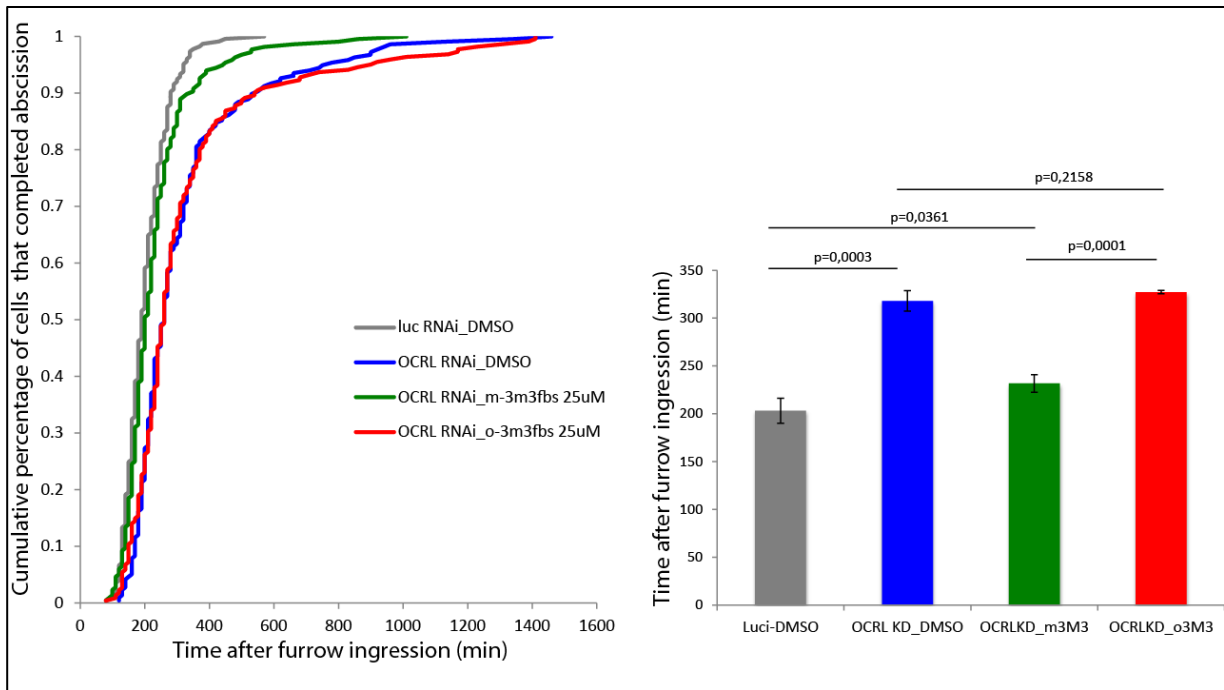


Figure 3.S4 related to figure 3.5

### 3.7 REFERENCES

- 1 Balla, T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev* **93**, 1019-1137, doi:10.1152/physrev.00028.2012 (2013).
- 2 Cauvin, C. & Echard, A. Phosphoinositides: Lipids with informative heads and mastermind functions in cell division. *Biochimica et biophysica acta* **1851**, 832-843, doi:10.1016/j.bbaliip.2014.10.013 (2015).
- 3 Viaud, J. *et al.* Phosphoinositides: Important lipids in the coordination of cell dynamics. *Biochimie* **125**, 250-258, doi:10.1016/j.biochi.2015.09.005 (2016).
- 4 Mehta, Z. B., Pietka, G. & Lowe, M. The cellular and physiological functions of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic* **15**, 471-487, doi:10.1111/tra.12160 (2014).
- 5 Ben El Kadhi, K., Emery, G. & Carreno, S. The unexpected role of Drosophila OCRL during cytokinesis. *Communicative & integrative biology* **5**, 291-293, doi:10.4161/cib.19914 (2012).
- 6 Ben El Kadhi, K., Roubinet, C., Solinet, S., Emery, G. & Carreno, S. The Inositol 5-Phosphatase dOCRL Controls PI(4,5)P2 Homeostasis and Is Necessary for Cytokinesis. *Current biology : CB* **21**, 1074-1079, doi:10.1016/j.cub.2011.05.030 (2011).
- 7 Cauvin, C. *et al.* Rab35 GTPase Triggers Switch-like Recruitment of the Lowe Syndrome Lipid Phosphatase OCRL on Newborn Endosomes. *Curr Biol* **26**, 120-128, doi:10.1016/j.cub.2015.11.040 (2016).
- 8 Choudhury, R. *et al.* Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Molecular biology of the cell* **16**, 3467-3479, doi:10.1091/mbc.E05-02-0120 (2005).
- 9 Dambournet, D. *et al.* Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol* **13**, 981-988, doi:10.1038/ncb2279 (2011).
- 10 Erdmann, K. S. *et al.* A role of the Lowe syndrome protein OCRL in early steps of the endocytic pathway. *Dev Cell* **13**, 377-390, doi:S1534-5807(07)00304-8 [pii] 10.1016/j.devcel.2007.08.004 (2007).

- 11 Ungewickell, A., Ward, M. E., Ungewickell, E. & Majerus, P. W. The inositol polyphosphate 5-phosphatase Ocr1 associates with endosomes that are partially coated with clathrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 13501-13506, doi:10.1073/pnas.0405664101 (2004).
- 12 Vicinanza, M. *et al.* OCRL controls trafficking through early endosomes via PtdIns4,5P(2)-dependent regulation of endosomal actin. *EMBO J*, doi:10.1038/emboj.2011.354 (2011).
- 13 Oltrabella, F. *et al.* The Lowe syndrome protein OCRL1 is required for endocytosis in the zebrafish pronephric tubule. *PLoS Genet* **11**, e1005058, doi:10.1371/journal.pgen.1005058 (2015).
- 14 Emoto, K., Inadome, H., Kanaho, Y., Narumiya, S. & Umeda, M. Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis. *J Biol Chem* **280**, 37901-37907, doi:M504282200 [pii] 10.1074/jbc.M504282200 (2005).
- 15 Field, S. J. *et al.* PtdIns(4,5)P2 functions at the cleavage furrow during cytokinesis. *Curr Biol* **15**, 1407-1412, doi:S0960-9822(05)00707-4 [pii] 10.1016/j.cub.2005.06.059 (2005).
- 16 Roubinet, C. *et al.* Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J Cell Biol* **195**, 99-112, doi:10.1083/jcb.201106048 (2011).
- 17 Liu, J., Fairn, G. D., Ceccarelli, D. F., Sicheri, F. & Wilde, A. Cleavage furrow organization requires PIP(2)-mediated recruitment of anillin. *Curr Biol* **22**, 64-69, doi:10.1016/j.cub.2011.11.040 (2012).
- 18 Naguib, A. *et al.* PTEN functions by recruitment to cytoplasmic vesicles. *Molecular cell* **58**, 255-268, doi:10.1016/j.molcel.2015.03.011 (2015).
- 19 Shinde, S. R. & Maddika, S. PTEN modulates EGFR late endocytic trafficking and degradation by dephosphorylating Rab7. *Nature communications* **7**, 10689, doi:10.1038/ncomms10689 (2016).
- 20 Maehama, T. & Dixon, J. E. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**, 13375-13378 (1998).

- 21 Varnai, P. *et al.* Quantifying lipid changes in various membrane compartments using lipid binding protein domains. *Cell Calcium*, doi:10.1016/j.ceca.2016.12.008 (2016).
- 22 Szentpetery, Z., Balla, A., Kim, Y. J., Lemmon, M. A. & Balla, T. Live cell imaging with protein domains capable of recognizing phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; a comparative study. *BMC cell biology* **10**, 67, doi:1471-2121-10-67 [pii] 10.1186/1471-2121-10-67 (2009).
- 23 Worby, C. A. & Dixon, J. E. Pten. *Annual review of biochemistry* **83**, 641-669, doi:10.1146/annurev-biochem-082411-113907 (2014).
- 24 Smith, R. J. *et al.* Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **253**, 688-697 (1990).
- 25 Gellatly, S. A., Kalujnaia, S. & Cramb, G. Cloning, tissue distribution and sub-cellular localisation of phospholipase C X-domain containing protein (PLCXD) isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* **424**, 651-656, doi:10.1016/j.bbrc.2012.06.079 (2012).
- 26 Bae, Y. S. *et al.* Identification of a compound that directly stimulates phospholipase C activity. *Molecular pharmacology* **63**, 1043-1050 (2003).
- 27 Ramirez, I. B. *et al.* Impaired neural development in a zebrafish model for Lowe syndrome. *Hum Mol Genet* **21**, 1744-1759, doi:10.1093/hmg/ddr608 (2012).
- 28 Song, M. S., Salmena, L. & Pandolfi, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 283-296, doi:10.1038/nrm3330 (2012).
- 29 Corbalan-Garcia, S. & Gomez-Fernandez, J. C. Signaling through C2 domains: more than one lipid target. *Biochimica et biophysica acta* **1838**, 1536-1547, doi:10.1016/j.bbamem.2014.01.008 (2014).
- 30 Li, C. *et al.* Ca(2+)-dependent and -independent activities of neural and non-neural synaptotagmins. *Nature* **375**, 594-599, doi:10.1038/375594a0 (1995).
- 31 Kim, S. D. *et al.* Phospholipase C activator m-3M3FBS protects against morbidity and mortality associated with sepsis. *J Immunol* **189**, 2000-2005, doi:10.4049/jimmunol.1200635 (2012).

## Discussion, perspectives et conclusion

Les recherches présentées dans le chapitre deux ont confirmé le rôle important que joue le PI(4,5)P2 durant la cytokinèse. En effet, nos travaux ont démontré que le PI(4,5)P2 pouvait servir de repère spatial principal pour la machinerie de cytokinèse. Dans des conditions sauvages, deux signaux majeurs régulent le PI(4,5)P2 au cours de la cytokinèse. Premièrement, dOCRL contrôle la régulation endomembranaire négative du PI(4,5)P2 afin de restreindre ce PIP à la membrane plasmique. Deuxièmement, PTEN et Skittles régulent positivement le PI(4,5)P2 au niveau du cortex cellulaire. D'abord ce dernier est distribué de façon uniforme sur la membrane plasmique pour permettre l'arrondissement des cellules en métaphase. Par la suite, le PI(4,5)P2 est concentré au niveau de l'équateur pour permettre le recrutement de la machinerie de cytokinèse. Lorsque dOCRL est déplétée, l'homéostasie du PI(4,5)P2 est dérégulée. Ce dernier s'accumule sur les endomembranes et recrute de façon ectopique la machinerie de cytokinèse. Le sillon de clivage n'est alors plus localisé sur la membrane plasmique ce qui cause des défauts de cytokinèse.

Dans le chapitre 3, nous décrivons une nouvelle fonction de PTEN qui régule le niveau de PI(4,5)P2. Cette fonction est complètement indépendante de son activité phosphatase et ne dépend que de deux domaines de PTEN : le domaine PBD et le domaine C2. PBD-C2 permet de réduire la concentration de PI(4,5)P2 endomembranaire dans les conditions pathologiques du syndrome de Lowe en activant la PLC CG14945. En plus de décrire une nouvelle fonction de PTEN, nos travaux démontrent que l'activation des PLC réduit efficacement le niveau de PI(4,5)P2 dans les conditions pathologiques du Syndrome de Lowe. Cette activation pourrait représenter une avenue thérapeutique pour cette maladie.

Ce nouveau rôle des domaines PBD-C2 de PTEN génère plusieurs questionnements sur la fonction physiologique de PTEN envers le PI(4,5)P2 et son rôle au niveau des endosomes.

D'autre part, nos travaux soulèvent plusieurs questions sur la fonction de PTEN, de dOCRL et sur le rôle du PI(4,5)P2. Dans cette section, nous allons essayer de répondre à certaines de ces questions et ouvrir des pistes pour les recherches à venir.

Les figures de cette section sont présentées dans l'annexe I.

## **1-Quelles sont les causes de la régression du sillon de clivage lorsque dOCRL est déplétée?**

Plusieurs causes peuvent expliquer la régression du sillon de clivage

-Affaiblissement du sillon de clivage :

Dans des conditions sauvages, la majorité des molécules d'actine, de myosine et d'anilline se concentrent au niveau de l'équateur cellulaire. Cet enrichissement permettrait au sillon de clivage de générer une force pour permettre la division des deux cellules filles. Cette force de constriction génère un stress mécanique sur la paroi cellulaire, qui se traduit par une augmentation de la tension corticale. Au cours de cette étude, nous avons observé le recrutement ectopique d'une sous-population de la machinerie de cytokinèse sur des endomembranes ce qui pourrait affaiblir le sillon de clivage. Ces derniers ne seraient plus capables de générer suffisamment de force pour atteindre la formation du pont intercellulaire, ce qui causerait la binucleation.

-Blocage physique par les vacuoles :

Une autre possibilité pour expliquer l'échec de la division cellulaire lorsque dOCRL est déplétée, est un blocage mécanique du sillon de clivage par les vacuoles enrichies en PI(4,5)P2. Nous avons observé que les recrutements ectopiques de la machinerie de cytokinèse créent des pseudo-sillons de clivage sur ces vacuoles. Ceci suggère que cette machinerie, ectopiquement localisée, est capable de générer une force de constriction. La force de constriction associée à un élargissement des vacuoles causées par la déplétion de dOCRL pourrait augmenter la tension endomembranaire. De plus nous avons observé que dans les cellules déplétées pour dOCRL, les vacuoles en anaphase B migrent vers l'axe du sillon de clivage et se concentrent sur le plan équatorial de la cellule (figure 4.1). Cette migration suggère l'existence d'un mécanisme qui permettrait de localiser les endosomes ou la machinerie de cytokinèse au niveau du sillon de clivage. Ce mécanisme pourrait dépendre de Rab35 (qui interagit avec OCRL1) et/ou de Rab11 (qui colocalise avec dOCRL). Ces deux Rab régulent le trafic vésiculaire vers le sillon de clivage et le pont intercellulaire (54, 235, 236). Dans des conditions normales, ce mécanisme pourrait, par exemple, permettre un apport supplémentaire de membranes en fusionnant avec le sillon de clivage (237). L'élargissement des vacuoles, l'augmentation possible de leur pression interne et l'accumulation des vacuoles

sur l'axe du sillon de clivage, pourraient créer une barrière physique qui bloque la progression du sillon de clivage lorsque dOCRL est déplétée.

-Défaut d'abscission :

La déplétion d'OCRL1 dans les cellules humaines cause un retard de l'abscission des deux cellules filles. Ce retard est corrélé à l'accumulation ectopique de filaments d'actine au niveau du pont intercellulaire (54). Dans les conditions sauvages, l'interaction entre OCRL1 et Rab35, permet la dépolymérisation de l'actine au niveau du pont intercellulaire. Dans notre modèle de S2, bien que le phénotype observé suggère un effet plus précoce durant la division cellulaire avec une régression du sillon de clivage, dOCRL pourrait aussi avoir un rôle important au cours de l'abscission.

## **2-Quel est le rôle du PI(3,4,5)P3 dans la cytokinèse?**

Dans cette thèse, je me suis concentré sur la caractérisation du rôle du PI(4,5)P2 comme un des marqueurs spatiaux principaux du positionnement du sillon de clivage. Mais d'autres observations réalisées au cours de ces travaux, permettent d'émettre l'hypothèse que d'autres PIPs pourraient jouer un rôle dans la spécification du positionnement du sillon de clivage et plus précisément, le PI(3,4,5)P3. Ce dernier est enrichi au niveau du sillon de clivage en anaphase B (194). Cette accumulation de PI(3,4,5)P3 serait un substrat pour la production d'un bassin mineur de PI(4,5)P2 au niveau du sillon de clivage (51). En effet, la déplétion de PTEN, dans les cellules S2, entraîne une augmentation de la quantité de PI(3,4,5)P3 au sillon de clivage (194). Cependant, plusieurs éléments nous permettent de croire que le PI(3,4,5)P3 joue un rôle plus important dans la localisation du sillon de clivage.

Premièrement, le PI(3,4,5)P3 n'est pas un PIP constitutif et n'est produit que suite à une stimulation spécifique (62). De plus, la source principale du PI(3,4,5)P3 est la phosphorylation à la position D3, par la PI3-Kinase, du PI(4,5)P2 (238). Ainsi, limiter le rôle du PI(3,4,5)P3 au sillon de clivage à la production du bassin non essentiel de PI(4,5)P2 est énergétiquement défavorable pour la cellule et donc peu probable.

Deuxièmement, plusieurs éléments de la machinerie de cytokinèse tels que l'anilline, RhoA et Ect2 lient au moins autant (si ce n'est plus) le PI(3,4,5)P que le PI(4,5)P2 (72).

Enfin, nos résultats non publiés montrent que la déplétion de dOCRL dans les cellules S2 entraîne aussi une accumulation ectopique de PI(3,4,5)P3 au niveau des endomembranes (figure 4.2). Ceci suggère que dOCRL, qui est connu pour avoir une fonction minoritaire de 5-phosphatase pour le PI(3,4,5)P3, pourrait réguler aussi ce dernier.

D'un côté, il est tout à fait possible que le PI(3,4,5)P3 au niveau du sillon de clivage joue aussi un rôle de repère spatial, complémentaire ou compétitif avec le PI(4,5)P2. Il permettrait ainsi le recrutement de certains membres de la machinerie de cytokinèse. D'un autre côté, il est aussi possible que l'accumulation de PI(3,4,5)P3 endomembranaire, lorsque dOCRL est déplétée, ne soit que la conséquence d'une tentative de la cellule de réduire le niveau du PI(4,5)P2 endomembranaire en activant les PI-3Kinases. Nonobstant ces possibilités, ces données suggèrent que le PI(3,4,5)P3 pourrait jouer un rôle dans la cytokinèse qui est, jusqu'à ce jour, sous-estimé. Le traitement des cellules en métaphase avec un inhibiteur chimique des PI-3Kinases, permettrait de bloquer la production du PI(3,4,5)P3 durant l'anaphase. La caractérisation de la localisation des différents membres de la machinerie de cytokinèse pourrait nous renseigner sur la participation potentielle du PI(3,4,5) comme repère spatial.

### **3-Est ce que PBD-C2 se localise au niveau des lysosomes ?**

Au cours de la dernière année de mon doctorat, avec Virginie Mondin [VM], nous nous sommes intéressés à la localisation vacuolaire de PBD-C2. Nous avons observé que la forme PBD-C2 fusionnée à la mCherry (mais pas PBD-C2-GFP) se localise au niveau de structures vacuolaires (figure 4.3). D'un côté, ces structures pourraient être des agrégats de mCherry. D'un autre côté, il est connu que les milieux à pH acide bloquent la fluorescence de la GFP, mais pas celle du mCherry (239). Ceci nous a permis d'émettre l'hypothèse que PBD-C2 localise à l'intérieur des lysosomes. Pour tester cette hypothèse, nous avons d'abord utilisé un marqueur du lysosome : le lysotracker. Ce dernier est incorporé dans des cellules vivantes exprimant PBD-C2-mCherry ou le vecteur mCherry vide. Dans des cellules non traitées au dsRNA, nous avons observé que le vecteur mCherry vide ne colocalise pas avec le marqueur du lysosome. À l'inverse, la construction PBD-C2-mCh présente un niveau élevé de colocalisation avec le lysotracker (Figure 4.4). Par la suite, nous avons utilisé un anticorps anti-LAMP1, une glycoprotéine associée aux membranes lysosomales, pour marquer des cellules exprimant PBD-C2-mCherry. Les résultats de l'immunofluorescence (figure 4.5)



montrent une localisation de LAMP1 autour des vacuoles positives pour PBD-C2-mCherry. Ceci montre que PBD-C2 colocalise avec les lysosomes. Puis, nous avons voulu tester si la forme entière de PTEN possède la même localisation que PBD-C2. Nous avons donc surexprimé PTEN-mCh et nous avons marqué les lysosomes avec le lysotracker. Nous avons observé, contrairement à PBD-C2, que la forme entière de PTEN localise au niveau de la membrane plasmique et ne colocalise pas avec le lysotracker (Figure 4.6). Sachant que la forme entière de PTEN sauve la déplétion de dOCRL et restaure l'homéostasie du PI(4,5)P2 sur les endomembranes, nous supposons que PTEN entier localise de façon transitoire au lysosome. Une fois le PI(4,5)P2 hydrolysé sur les endomembranes, le domaine phosphatase de PTEN permet son recrutement vers la membrane plasmique (discuté dans la section 5 de ce chapitre). Une expérience de vidéomicroscopie dans des cellules déplétées pour dOCRL pourrait nous renseigner sur la dynamique de PTEN entier et ses potentielles localisations lysosomales/membranaires.

#### **4-Est ce que PBD-C2 régule la fusion autophagosome-lysosome ?**

Le groupe de la Dre De Matteis a publié récemment un article qui montre que la déplétion d'OCRL1 perturbe le flux autophagique (240). En effet, suite à la déplétion d'OCRL1, l'accumulation du PI(4,5)P2 au niveau des lysosomes inhibe le canal calcique Mucolipine-1 et bloque ainsi la fusion lysosome-autophagosome essentielle pour la maturation du flux autophagique. Cette inhibition cause une accumulation d'autophagosomes dans les cellules déplétées pour OCRL1 (et aussi les cellules de patients atteints du syndrome de Lowe) et un élargissement des lysosomes. Plusieurs éléments indiquent un possible lien entre le phénotype de déplétion de dOCRL chez les S2 et les résultats du groupe du Dre De Matteis. Premièrement, dans les cellules S2, la déplétion de dOCRL perturbe le trafic vésiculaire et entraîne un élargissement des endosomes (et possiblement des lysosomes) avec une accumulation ectopique de PI(4,5)P2. Deuxièmement, PBD-C2 possède une localisation lysosomale. Troisièmement, PBD-C2 restaure l'homéostasie du PI(4,5)P2 en hydrolysant ce dernier sur les endomembranes (donc possiblement sur les lysosomes). Ces éléments nous ont permis d'émettre l'hypothèse que la restauration d'un phénotype normal, par PBD-C2, pourrait nécessiter l'hydrolyse du PI(4,5)P2 sur les lysosomes et la restauration du flux autophagique dans les cellules S2. Pour tester cette hypothèse, en collaboration avec Virginie

Mondin nous avons commencé par questionner l'effet de la déplétion de dOCRL sur le flux autophagique. Nous avons déplété dOCRL dans les S2 et nous avons marqué les autophagosomes avec un anticorps anti LC3. Nous avons observé par immunofluorescence que la déplétion de dOCRL entraîne une augmentation du nombre d'autophagosomes dans les cellules S2 (résultats non présentés). Cette perturbation du flux autophagique a aussi été confirmée par immunobuvardage contre la protéine LC3 (réalisé par VM). Cette augmentation des structures autophagiques suggère une conservation du rôle d'OCRL1 dans la régulation du flux autophagique, entre l'humain et la drosophile. Nous avons alors décidé de tester si le sauvetage de la déplétion de dOCRL par PBD-C2 dépend de la restauration du flux autophagique. Pour ce, nous avons surexprimé PBD-C2 dans des cellules déplétées pour dOCRL et traitées avec la chloroquine. Cette dernière inhibe la fusion autophagosomes-lysosomes en modifiant le pH des lysosomes (figure 4.7) (239)

Nos résultats préliminaires indiquent que l'inhibition de la fusion autophagosome-lysosome bloque le sauvetage de la déplétion de dOCRL par PBD-C2. Un autre inhibiteur du flux autophagique, la Concanamycine A, montre le même effet sur le sauvetage de la déplétion de dOCRL par PBD-C2 (n=2). Par la suite, nous nous sommes posés la question suivante : est-ce que PBD-C2 restaure la fusion autophagosome-lysosome en hydrolysant le PI(4,5)P2 de façon unilatérale sur les lysosomes? Ou est-ce qu'il est aussi localisé sur les autophagosomes? Pour essayer de répondre à cette question nous avons surexprimé PBD-C2-mCh dans des cellules déplétées (ou non) pour dOCRL et nous avons utilisé LC3 comme marqueur autophagique. Dans les cellules contrôles nous avons observé une colocalisation partielle de PBD-C2 avec le marqueur autophagique LC3 (figure 4.8). Ceci suggère que PBD-C2 localise au niveau des autophagosomes et/ou des autolysosomes. Dans les cellules déplétées pour dOCRL, nous avons observé une augmentation du nombre de structures autophagosomales comparativement aux cellules contrôles. Les cellules qui expriment PBD-C2 (marquées par des astérisques rouges sur la figure 4.9), présentent une réduction du nombre d'autophagosomes. Cette observation a été confirmée par la quantification de l'intensité moyenne de la fluorescence du marqueur LC3 (figure 4.10 réalisée par VM). Ensemble, les résultats précédents suggèrent que la surexpression de PBD-C2 sauve le phénotype de la déplétion de dOCRL en restaurant un flux autophagique normal. Cependant, cette observation soulève aussi plusieurs questions sur le phénotype de la déplétion de dOCRL :

**- Est ce que la perturbation du flux autophagique est à l'origine de la désorganisation des endosomes lorsque dOCRL est déplétée?**

Dans le chapitre deux nous avons montré que la déplétion de dOCRL entraîne une désorganisation des endosomes. Cette perturbation cause l'élargissement des endosomes et un recrutement anarchique des différents marqueurs des endomembranes (Rab5, 7 et 11). Dans le chapitre trois nous avons montré que PTEN restaure l'homéostasie du PI(4,5)P2 en l'hydrolysant sur les endomembranes. Ici, en supposant que le niveau de binucléation reflète la dérégulation de l'homéostasie du PI(4,5)P2, nos résultats préliminaires suggèrent que ce sauvetage dépend de la restauration du flux autophagique. D'un côté, il est possible que le blocage du flux autophagique crée un effet boule de neige et cause la désorganisation des endomembranes. Ces autophagosomes et lysosomes ayant perdu leurs signatures phospholipidiques à cause de l'accumulation du PI(4,5)P2, recruteraient les différents marqueurs des endosomes et perturberaient le trafic vésiculaire. D'un autre côté, il est aussi possible que la dérégulation du flux autophagique soit la conséquence et non la cause de la perturbation du trafic vésiculaire. En effet il a été montré que la perturbation de la petite GTPases Rab5 inhibe la fusion autophagosomes-lysosomes(241). De plus il a été démontré que plusieurs acteurs importants dans le trafic vésiculaire tels que Rab7, Rab11, la dynamine et PICALM, jouent des rôles importants dans la régulation du flux autophagique(242-244). Sachant que la déplétion de dOCRL entraîne une perturbation importante du trafic autophagique, il est possible que cette dernière soit la source de la dérégulation du flux autophagique. Finalement, une autre possibilité est que les deux événements se font en parallèle. OCRL se localise au niveau des endosomes et des lysosomes. La perte de dOCRL peut entraîner une désorganisation simultanée de l'autophagie et du trafic vésiculaire sans lien de causalité entre les deux.

**-Est-ce que la perturbation du flux autophagique passe par la désorganisation du réseau d'actine quand dOCRL est déplété?**

Il a été démontré que l'actine joue plusieurs rôles importants dans la régulation du flux autophagique (245). Aussi, plusieurs protéines telles que le complexe BAG3-HSPB8, régulent non seulement le cytosquelette d'actine et le flux autophagique, mais sont aussi important pour la cytokinèse (246-249). Sachant que la déplétion de dOCRL induit une accumulation ectopique d'actine au niveau des endomembranes, il est possible que les défauts d'autophagie

observés soient la conséquence de la dérégulation du cytosquelette d'actine. Ainsi le sauvetage du flux autophagique par PBD-C2 pourrait passer par la dépolymérisation de l'actine au niveau des endosomes suite à l'hydrolyse du PI(4,5)P2 par la PLCXD. Il est possible de tester cette hypothèse en quantifiant les autophagosomes/ autolysosomes dans des cellules déplétées pour dOCRL et traitées avec des drogues qui inhibent la polymérisation de l'actine, tel que Latrunculine A.

### **- Est-ce que la restauration du flux autophagique dépend de l'activation des PLC par PBD-C2?**

Nous avons montré que le sauvetage par PBD-C2 de la déplétion de dOCRL, dépend de l'activité des PLC. Il a été publié qu'une accumulation de PI(4,5)P2 sur les lysosomes bloque la fusion de ces derniers avec les autophagosomes. Par conséquent, PBD-C2 restaurerait probablement le flux autophagique en hydrolysant le PI(4,5)P2 au niveau lysosomal. Cependant, il est aussi possible que PBD-C2 régule le flux autophagique en régulant la fusion membranaire (indépendamment ou pas de l'hydrolyse du PI(4,5)P2). En effet, les domaines C2 peuvent réguler la fusion membranaire en modifiant la courbure des endomembranes (250, 251). Sachant que PBD-C2 se localise au niveau des autophagosomes et des lysosomes, une modification de la courbure membranaire de ces deux compartiments pourrait favoriser leurs fusions.

### **5-Est ce que le sauvetage par PBD-C2 reflète une fonction physiologique de PTEN?**

Le sauvetage que nous observons est la conséquence d'une surexpression des domaines PBD-C2 (ou de la forme entière de PTEN) dans des conditions pathologiques d'un modèle cellulaire du syndrome de Lowe. Une des questions des plus intéressantes qui reste posée est de savoir si la réduction du niveau du PI(4,5)P2 par PTEN reflète une fonction physiologique de ce dernier. L'autre possibilité est que cette fonction est artéfactuelle et causée par la perte de l'homéostasie du PI(4,5)P2 lorsque dOCRL est déplété. Notre hypothèse de travail est que dans des conditions physiologiques, PTEN active la PLC-XD sur les endomembranes pour réduire le niveau de PI(4,5)P2.

À première vue, deux éléments tendent à réfuter cette hypothèse. Le premier est la localisation de PTEN. Effectivement, la forme entière de PTEN localise généralement au niveau de la membrane plasmique (61) et nos résultats préliminaires montrent que PTEN entier ne localise pas au niveau des lysosomes (figure 4.6). Ceci suggère qu'à l'inverse de PBD-C2, la présence

des domaines phosphatases serait le signal de localisation majoritaire qui cible PTEN vers la membrane plasmique. Pourtant, même en présentant une localisation clairement membranaire PTEN et PTEN-C132S (chapitre trois-figure 1a) sont capables de sauver la déplétion de dOCRL et de restaurer l'homéostasie du PI(4,5)P2. Ces résultats suggèrent un modèle de recrutement compétitif de PTEN vers les régions riches en PI(4,5)P2. Selon ce modèle, dans des conditions pathologiques de déplétion de dOCRL, PTEN est recrutée sur des endomembranes riches en PI(4,5)P2. À ce niveau PTEN activerait la PLC-XD (CG14945) qui hydrolyse le PI(4,5)P2. Une fois ce dernier réduit, le recrutement compétitif de PTEN vers les zones riches en PI(4,5)P2 permet sa translocation vers la membrane plasmique. Ce modèle est corroboré par l'observation que lors d'une inhibition des PLC par un traitement avec le U-73122, PTEN-C132S présente une localisation endomembranaire (Chapitre trois, figure 3a). Ces résultats semblent indiquer que la régulation du niveau du PI(4,5)P2 sur les endomembranes par PTEN est possible dans les condition sauvages. Le deuxième élément qui tend à réfuter un rôle physiologique de PTEN sur les endomembranes, est le fait que dans des conditions normales la majorité du PI(4,5)P2 cellulaire est localisé au niveau de la membrane plasmique. Seulement très peu de PI(4,5)P2 est localisé sur des endomembranes. Pour que notre hypothèse soit correcte, cela nécessiterait donc que PTEN soit capable de se déplacer de la membrane plasmique vers les endomembranes quand le PI(4,5)P2 augmente sur ces dernières. Ou encore, que PTEN soit capable de se localiser sur les endomembranes de façon indépendante du PI(4,5)P2. Récemment, il a été démontré que PTEN est transportée le long des microtubules grâce à la liaison aux endosomes riches en PI(3)P (252). Ce dernier est, entre autres, important pour la fusion autophagosome-lysosome (253). La liaison à ce PIP dépend de la région CBR3 du domaine C2 (252). Nous avons alors construit PBD-C2 avec une mutation sur la région CBR3 du domaine C2 (PBD-C2-mCBR3) abolissant sa liaison au PI(3)P [construit par VM]. Nous avons observé par vidéo-microscopie que les vacuoles positives pour PBD-C2 sont très dynamiques. Alors que les vacuoles positives pour PBD-C2-mCBR3 sont plus statiques (avec VM). De plus, nos résultats préliminaires indiquent que la construction PBD-C2-mCBR3 ne sauve plus la déplétion de dOCRL (par VM). Ce résultat suggère que la localisation endosomale de PTEN est importante pour le sauvetage de la déplétion de dOCRL. Enfin et de façon importante, de récentes expériences montrent que lorsque PTEN est déplétée dans des cellules contrôles, on observe une accumulation de

PI(4,5)P2 au niveau endomembranaire (par VM). Ensemble, ces résultats indiquent que PTEN pourrait réguler de façon physiologique le niveau de PI(4,5)P2 sur les endomembranes. Cette nouvelle fonction de PTEN soulève aussi plusieurs questions :

Est-ce que cette fonction de PTEN se limite aux endomembranes? Ou est-ce que PTEN peut réguler négativement le niveau de PI(4,5)P2 sur la membrane plasmique? Comment PTEN active/recrute la PLC- $\gamma$ ? Pourquoi PTEN réduit-il le niveau de son propre produit? Vu que cette fonction dépend des domaines PBD-C2 de PTEN, est-elle spécifique à ce dernier? Ou est-elle commune avec d'autres protéines ayant un domaine de liaison au PI(4,5)P2 et un domaine C2? Comment fonctionne la PLC- $\gamma$ ?

Certaines expériences pourraient permettre de répondre à ces questions telles que :

- Dépléter PTEN et quantifier biochimiquement la variation de PI(4,5)P2 au niveau de la membrane plasmique et des endomembranes.
- Tester par co-immunoprécipitation l'interaction de PTEN, PBD, C2 ou PBD-C2 avec la PLC- $\gamma$ .
- Substituer le domaine PBD par d'autres domaines qui lient le PI(4,5)P2 ( région C-terminal de tubby ou le domaine PH de PLC $\delta$ 1) et substituer le domaine C2 de PTEN par d'autres domaines C2 [VM].
- Cloner et caractériser la PLC- $\gamma$  CG14945

De plus, PTEN pourrait jouer aussi un rôle important durant la division cellulaire normale. En effet, nous avons montré dans le laboratoire que PTEN localise au niveau du sillon de clivage et sa déplétion induit de l'instabilité corticale durant l'anaphase et un léger défaut de cytokinèse (61 et résultats non montrés).

Des études plus poussées permettront de déterminer si le rôle de PTEN au niveau du sillon de clivage consiste, entre autres, à réduire la quantité de PI(3,4,5)P3 (question 2 de cette section) en produisant plus de PI(4,5)P2. Ou à l'inverse, réduire la quantité du PI(4,5)P2 via les PLC.

## **6- Est ce PBD-C2 joue un rôle dans le noyau?**

PTEN joue plusieurs rôles importants dans le noyau et certaines de ces fonctions nucléaires sont totalement indépendantes de son activité phosphatase. Plusieurs signaux permettent la translocation de la forme humaine de PTEN au noyau : 1- Quatre NLS atypiques. 2- La

monoubiquitination des K13 et K289. 3- La Sumoylation de K254. 4- Le clivage du domaine c-terminal de PTEN par la caspase-3.

Nous avons observé que PBD-C2 possède une localisation partiellement nucléaire (figure 4.11). D'un côté, cette localisation pourrait être artéfactuelle et provenir de la fusion aux protéines fluorescentes (GFP ou mCh) et ne serait d'aucun intérêt pour nous. D'un autre côté, cette localisation pourrait être le reflet d'une fonction cellulaire. PBD-C2 disposerait de plusieurs signaux permettant sa translocation vers le noyau : 1- l'alignement des formes humaines et de drosophiles de PTEN montre une conservation des Lysines 13 et 254 (K18/19 et K266 chez la drosophile). 2- un NLS est localisé au niveau du PBD de drosophiles (16-VSKKRIRYK-24). 3- la chimère PBD-C2 étant exempt de la région C-terminal, mime le clivage de cette dernière par la caspase 3. Ces multiples signaux sont en faveur de la localisation nucléaire et pourraient expliquer la localisation nucléaire de PBD-C2. Les résultats obtenus durant l'analyse des domaines- fonctions (chapitre 3, figure S2) semblent indiquer que le domaine C2 fournit un signal majoritaire pour la localisation nucléaire de PTEN. Au niveau du noyau, PBD-C2, étant exempt de domaine phosphatase, pourrait réguler certaines fonctions indépendantes de son activité phosphatase. PBD-C2 pourrait aussi réguler le niveau de PI(4,5)P2 nucléaire. En effet, un bassin de PI(4,5)P2 nucléaire permettrait de réguler plusieurs fonctions telles que l'activation de PKC, la régulation du cycle cellulaire, de la transcription ou encore de l'apoptose (254). Sachant que plusieurs PLC, dont une PLC-XD, possèdent une localisation nucléaire (68, 255), il est tout à fait possible que PBD-C2 régule le niveau de PI(4,5)P2 nucléaire. Même si une telle régulation existait, il est possible qu'elle n'ait aucun impact sur le sauvetage de la déplétion de dOCRL par PBD-C2. Il est aussi possible que cette fonction participe à ce sauvetage à travers un mécanisme encore inconnu. Des mutations ponctuelles des signaux, qui permettent la localisation nucléaire (K266 par exemple) ou le rajout d'une séquence d'exportation nucléaire à PBD-C2, pourraient nous renseigner sur le rôle de PBD-C2 dans le noyau.

### **7- Est-ce que PBD-C2 est régulée par ROCK?**

La fonction du domaine C2 de PTEN peut être régulée par phosphorylation (100, 101); en effet, la kinase Rak phosphoryle le domaine C2 de PTEN humain sur le résidu Y336 (256). Cette phosphorylation empêche la polyubiquitination de PTEN par l'E3 Ubiquitine ligase

NEDD4-1 et prévient la dégradation de PTEN (100). Chez la drosophile, le site de phosphorylation par Rak ne semble pas être conservé. En plus de Rak, il a été démontré que, dans les leucocytes, la kinase ROCK phosphoryle le domaine C2 de PTEN sur les sites S229, T232, T319 et T321 (100, 257, 258). Deux de ces sites sont conservés chez la drosophile : T306 et S308. ROCK phosphoryle et active PTEN, ce qui permet sa translocation vers la membrane plasmique où il colocalise avec ROCK et RhoA (258). Sachant que nous avons montré dans le chapitre deux que RhoA est ectopiquement enrichie au niveau des endomembranes, nous pouvons émettre l'hypothèse que RhoA participerait au recrutement endomembranaire de PBD-C2 via la phosphorylation par ROCK. Afin de tester cette hypothèse, nous pouvons réaliser l'expérience de sauvetage de la déplétion de dOCRL par PBD-C2 muté sur les résidus T306A et/ou S308A.

#### **8- Est-ce que PBD-C2 sauve les phénotypes de la déplétion de dOCRL par une régulation de la concentration intracellulaire de calcium?**

Le calcium est un second messager ubiquitaire dans toutes les cellules eucaryotes (69). En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium régule plusieurs processus cellulaires dont : la prolifération, la morphogenèse, la cytokinèse, l'autophagie, le trafic vésiculaire et l'apoptose (259). Durant la cytokinèse, il a été démontré que la concentration de calcium augmente à proximité du sillon de clivage chez l'embryon du poisson zébré (260, 261). La séquestration du calcium avec un chélateur tel que BAPTA (1,2-bis(aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid) conduit à l'échec de la cytokinèse (260, 262). Inversement, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire entraîne la formation de sillon de clivage surnuméraire (260, 263). En plus de cette fonction, le calcium régule plusieurs autres processus qui peuvent être impliqués dans le sauvetage de PBD-C2. En effet le calcium favorise la fusion endomembranaire (264), il active les PLC (68), dépolymérise les filaments d'actines en activant la gelsoline (83) et stimule la formation des autophagosomes et l'autophagie (265-268). Ainsi, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium libre pourrait représenter « un fil conducteur » qui régulerait plusieurs processus qui sont perturbés lorsque dOCRL est déplétée. Effectivement, il a été démontré que la libération du calcium lysosomal par le canal calcique mucopolipine-1 active la calcineurine (265). Cette dernière est une phosphatase dépendante du calcium qui régule positivement l'autophagie et la fusion autophagosome-lysosomes (240, 265). La déplétion



d'OCRL1 dans les cellules de mammifères inhibe la mucolipine-1 et bloque la maturation des autophagosomes. Ces éléments nous permettent d'émettre deux hypothèses : premièrement, le sauvetage de ce processus par PBD-C2 pourrait passer la régulation, via les PLC, du niveau du PI(4,5)P2 lysosomal permettant la libération du calcium lysosomal par les mucolipine-1 et l'activation de la calcineurine. Alternativement, PBD-C2 pourrait activer la calcineurine en induisant une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, indépendamment de la mucolipine-1, par l'activation de PLC. Cette dernière en hydrolysant un bassin de PI(4,5)P2 (autre que lysosomal), produirait l'IP3 qui permet de libérer le calcium stocké dans le RE. L'augmentation de la concentration calcique servirait de « fil conducteur » et activerait plusieurs processus, susmentionnés, permettant de rétablir un phénotype normal suite à la déplétion de dOCRL. En plus, d'autres éléments appuient l'hypothèse que l'augmentation de la concentration du calcium peut contrecarrer la déplétion de dOCRL. En effet, la calcineurine régule plusieurs fonctions cellulaires dont l'autophagie (269). Elle activerait notamment la 5-phosphatase Synaptojanine (270). Cette dernière, tout comme OCRL, est une 5-phosphatase qui dephosphoryle le PI(4,5)P2 (67, 271). Elle localise au niveau des endosomes tout comme OCRL1 et régule l'endocytose médiée par la clathrine. Ces éléments nous permettent d'émettre l'hypothèse que l'activation de la Synaptojanine par la calcineurine pourrait compenser la déplétion de dOCRL. Effectivement, nos résultats préliminaires indiquent que la codéplétion de la Synaptojanine et de dOCRL bloque le sauvetage par PBD-C2. Ceci nous permet de spéculer sur le rôle de l'activation de la PLC CG14945 par PBD-C2. Premièrement, le modèle le plus simple est que PBD-C2 active la PLC-XD qui permet l'hydrolyse à large échelle du PI(4,5)P2 endomembranaire et restaure l'homéostasie du PI(4,5)P2. Deuxièmement, l'activation de CG14945 par PBD-C2 hydrolyse un bassin limité de PI(4,5)P2. Ce dernier ne servirait que de « gâchette » qui permet l'augmentation du niveau de calcium et active d'autres PLC, la synaptojanine, la dépolymérisation de l'actine, la fusion autophagosome-lysosome...

Il est très probable que toutes ces hypothèses ne soient pas mutuellement exclusives et que plusieurs mécanismes collaborent à différents niveaux pour rétablir l'homéostasie du PI(4,5)P2,

Une façon de tester si l'augmentation du niveau de calcium est impliquée dans le sauvetage de la déplétion de dOCRL par PBD-C2 (ou PTEN), consiste à réaliser l'expérience de sauvetage

en présence d'un chélateur du calcium tel que BAPTA. Sachant que l'utilisation de ce chélateur induit un défaut de cytokinèse par lui même (262), l'accumulation de PI(4,5)P2 endomembranaire pourrait servir de mesure pour le sauvetage par PBD-C2. Une autre façon de tester cette hypothèse serait d'induire une augmentation durable du niveau de calcium dans des cellules déplétées pour dOCRL est de tester si cette dernière est suffisante pour sauver les phénotypes de la déplétion de dOCRL.

### **9- Est-ce que PBD-C2 joue un rôle durant l'abscission?**

Dans les cellules HeLa, il a été démontré qu'OCRL1 et Rab35 interagissent ensemble pour réguler négativement la polymérisation de l'actine au niveau du pont intercellulaire (54). La déplétion d'OCRL1 ou de Rab35 entraîne l'accumulation de PI(4,5)P2 au niveau du pont intercellulaire. Cette accumulation favorise la polymérisation de l'actine qui pourrait être la cause du retard de l'abscission des deux cellules filles (54). Dans les cellules S2 de drosophiles, les défauts de cytokinèses que nous avons rapportés sont plus drastiques que ceux observés chez les cellules de mammifères. En effet, la déplétion de dOCRL entraîne une accumulation de PI(4,5)P2 sur les endomembranes qui recrutent différents membres de la machinerie de cytokinèse. Cette régression peut être très précoce, c'est à dire, au tout début de l'ingression du sillon de clivage. Elle peut être aussi tardive, c'est à dire, après la formation du midbody. En effet, dans la figure 4b du chapitre deux, nous pouvons voir le midbody marqué avec l'anilline et la MRLC. Dans les cellules contrôles, le midbody est situé entre les deux cellules filles. Alors que dans les cellules déplétées pour dOCRL, le midbody est localisé à l'intérieur de la cellule. Ce phénotype nous a poussés à faire une caractérisation plus précise de la localisation de dOCRL en fin de cytokinèse. Nous avons observé que la forme GFP de dOCRL, tout comme OCRL1, se localise au niveau du pont intercellulaire. De plus cette localisation semble être dépendante de Rab35 (figure 4.12). Finalement, la déplétion de Rab35 dans les cellules S2, phénocopie la déplétion de dOCRL en ce qui concerne la binucléation et l'élargissement des endomembranes (données non montrées). Ensemble, ces éléments suggèrent un rôle de dOCRL similaire à OCRL1 humain durant l'abscission. Récemment, nous avons observé que PBD-C2-GFP se localise au niveau du pont intercellulaire et au midbody (figure 4.13). Dans le laboratoire nous avons précédemment observé que certaines protéines fusionnées à la GFP pouvaient localiser au pont intercellulaire de façon artéfactuelle.

C'est possiblement le cas pour PBD-C2-GFP. Cependant, il a été démontré que les endosomes riches en PI(3)P sont nécessaires pour la localisation de la machinerie de l'abscission (tels que des sous-unités de la machinerie ESCRT) au niveau du pont intercellulaire (51, 62). De plus il a été démontré que le domaine C2 de PTEN se lie au PI(3)P grâce à la région CBR3 (252). Finalement, nos résultats préliminaires suggèreraient que le mutant PBD-C2-mCBR3 ne sauve plus la déplétion de dOCRL (par VM). Tous ces éléments, associés au fait que dOCRL aurait une fonction durant l'abscission, suggèrent que PBD-C2 peut sauver la déplétion de dOCRL en jouant, aussi, un rôle durant l'abscission cellulaire. La forme entière de PTEN localise au niveau du sillon de clivage et du pont intercellulaire. Ces données peuvent nous permettre de poser les questions suivantes : est-ce que PTEN a un rôle durant l'abscission? Si oui est-il dépendent de son activité phosphatase?

### **10-Les cellules S2 : un modèle pour le syndrome de Lowe?**

Le syndrome de Lowe est une maladie génétique rare causée par des mutations sur le gène *OCRL*. Les patients atteints par le syndrome de Lowe souffrent d'une myriade de symptômes essentiellement au niveau oculaire, cérébral et rénal. Cependant, la majorité des causes cellulaires de ces symptômes reste inconnue. Il a été démontré que OCRL1 est impliquée dans plusieurs processus cellulaires tels que la phagocytose, la migration, le trafic vésiculaire, la ciliogenèse et la cytokinèse. Malgré cela, peu de liens entre les phénotypes cellulaires et les manifestations pathologiques chez les patients ont été établis. L'implication d'OCRL1 dans une multitude de fonctions cellulaires associées à la redondance fonctionnelle partagée avec INPP5B rend l'étude du syndrome de Lowe difficile chez les mammifères. Nos travaux ont mis en évidence le fait que les cellules S2 peuvent être un modèle puissant pour le syndrome de Lowe. En effet, plusieurs phénotypes que nous avons observés dans les cellules S2 suite à la déplétion de dOCRL ont été rapportés dans des cellules de mammifères ou de patients :

- La désorganisation des endosomes (163).
- L'accumulation ectopique de PI(4,5)P2 et de F-actine au niveau des endomembranes (163).
- Des défauts de cytokinèse (54).
- La perturbation de l'autophagie (240).

Pour la majorité de ces phénotypes, les cellules S2 montrent des défauts plus graves que ceux observés chez les cellules de mammifères. Cette différence, qui est probablement due à la

redondance avec INPP5B chez les mammifères, place les cellules S2 comme un modèle cellulaire prometteur pour l'étude du syndrome de Lowe. De plus, nous avons observé un niveau de conservation élevée entre les fonctions de dOCRL et OCRL1. Ainsi, l'expression d'OCRL1b humain sauve la déplétion de dOCRL dans les cellules S2 (figure 4.14). De plus, l'activateur chimique des PLC est capable de renverser plusieurs phénotypes de la déplétion d'OCRL1 dans les cellules S2, dans un modèle *in vivo* du syndrome de Lowe mais aussi et surtout dans des cellules de patients. Cette étude a montré que la binucléation cellulaire dans les cellules S2 peut servir d'indicateur (readout) fiable et rapide de phénotypes plus complexes du syndrome de Lowe. Tous ces éléments témoignent du potentiel des cellules S2 en tant que modèle cellulaire pour cette maladie. Ce modèle pourrait permettre une meilleure compréhension des fonctions moléculaire et des voies de signalisations régulées par OCRL1. Cependant, comme tout modèle cellulaire, les cellules S2 possèdent des points faibles. En effet, la simplicité génomique peut s'avérer être un couteau à double tranchant simplifiant trop des voies de signalisation dans lesquels OCRL1 est impliquée. De plus, la déplétion de dOCRL dans les cellules S2 ne reflète pas la variété des phénotypes constatées chez les patients. D'autre part, dans le laboratoire, nous avons essayé d'adapter le phénotype de binucléation observé en absence de dOCRL à un criblage haut débit afin d'identifier des interacteurs fonctionnels à cette protéine (travail de Maissa Babouder). Cette tâche s'est avérée fastidieuse et compliquée, possiblement à cause de la petite taille des S2 (non adapté à la microscopie automatique). Malgré ces défauts, nous pensons qu'une étude utilisant les cellules S2 pourrait faire la différence pour une meilleure compréhension du syndrome de Lowe, à condition, bien entendu, de confirmer les résultats obtenus avec des modèles *in vivo* (tel que le poisson zébré) ainsi que des cellules de patients.

En conclusion, nos travaux nous ont permis de confirmer notre hypothèse de recherche et de montrer le rôle du PI(4,5)P2 comme repère spatial pour la localisation du sillon de clivage. En parallèle, nous avons démontré un nouveau rôle de la protéine dOCRL dans la division cellulaire. De façon inattendue, nos données nous ont conduit à mettre en lumière une nouvelle fonction de PTEN. Cette dernière pourrait non seulement avoir un impact positif sur la compréhension de certains cancers, mais représente aussi une potentielle avenue thérapeutique pour le Syndrome de Lowe. Finalement, nous proposons que les cellules S2

soient un modèle prometteur pour l'étude du syndrome de Lowe. Ce modèle pourrait potentiellement permettre une meilleure compréhension de cette maladie orpheline et ainsi accélérer la découverte d'un traitement.

## Bibliographie

1. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol.* 2013;40(6):463-71.
2. Weinberg R. *The Biology of Cancer.* 2nd ed: Garland Science; 2014.
3. Lacroix B, Maddox AS. Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. *J Pathol.* 2012;226(2):338-51.
4. O'Connor C. *Cell Division: Stages of Mitosis* 2008.
5. Cooper GM. *The Cell: A Molecular Approach:* Sinauer Associates; 2000.
6. Harvey Lodish aB, Paul Matsudaira. *Molecular Cell Biology.* 4th ed: W. H. Freeman; 2000.
7. Sivakumar S, Gorbsky GJ. Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16(2):82-94.
8. Bruce Alberts AJ, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed: garland science; 2002.
9. Cadart C, Zlotek-Zlotkiewicz E, Le Berre M, Piel M, Matthews HK. Exploring the function of cell shape and size during mitosis. *Dev Cell.* 2014;29(2):159-69.
10. Wang Y, Seemann J. Golgi biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(10):a005330.
11. D'Avino PP, Giansanti MG, Petronczki M. Cytokinesis in animal cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4):a015834.
12. Barr FA, Gruneberg U. Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell.* 2007;131(5):847-60.
13. Clark AG, Paluch E. Mechanics and regulation of cell shape during the cell cycle. *Results Probl Cell Differ.* 2011;53:31-73.
14. Lancaster OM, Le Berre M, Dimitracopoulos A, Bonazzi D, Zlotek-Zlotkiewicz E, Picone R, et al. Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation. *Dev Cell.* 2013;25(3):270-83.
15. Lenart P, Bacher CP, Daigle N, Hand AR, Eils R, Terasaki M, et al. A contractile nuclear actin network drives chromosome congression in oocytes. *Nature.* 2005;436(7052):812-8.

16. Collins ES, Balchand SK, Faraci JL, Wadsworth P, Lee WL. Cell cycle-regulated cortical dynein/dynactin promotes symmetric cell division by differential pole motion in anaphase. *Mol Biol Cell*. 2012;23(17):3380-90.
17. Rappaport R. Experiments concerning the cleavage stimulus in sand dollar eggs. *J Exp Zool*. 1961;148:81-9.
18. Green RA, Paluch E, Oegema K. Cytokinesis in animal cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:29-58.
19. Rappaport R. Repeated furrow formation from a single mitotic apparatus in cylindrical sand dollar eggs. *J Exp Zool*. 1985;234(1):167-71.
20. Fededa JP, Gerlich DW. Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat Cell Biol*. 2012;14(5):440-7.
21. Piekny A, Werner M, Glotzer M. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol*. 2005;15(12):651-8.
22. Bement WM, Miller AL, von Dassow G. Rho GTPase activity zones and transient contractile arrays. *Bioessays*. 2006;28(10):983-93.
23. Tcherkezian J, Lamarche-Vane N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell*. 2007;99(2):67-86.
24. D'Avino PP, Savoian MS, Capalbo L, Glover DM. RacGAP50C is sufficient to signal cleavage furrow formation during cytokinesis. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 21):4402-8.
25. Mishima M, Pavicic V, Gruneberg U, Nigg EA, Glotzer M. Cell cycle regulation of central spindle assembly. *Nature*. 2004;430(7002):908-13.
26. Mishima M, Kaitna S, Glotzer M. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev Cell*. 2002;2(1):41-54.
27. Mishima M. Centralspindlin in Rappaport's cleavage signaling. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;53:45-56.
28. Douglas ME, Davies T, Joseph N, Mishima M. Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Curr Biol*. 2010;20(10):927-33.
29. Pavicic-Kaltenbrunner V, Mishima M, Glotzer M. Cooperative assembly of CYK-4/MgcRacGAP and ZEN-4/MKLP1 to form the centralspindlin complex. *Mol Biol Cell*. 2007;18(12):4992-5003.

30. Zhuravlev Y, Hirsch SM, Jordan SN, Dumont J, Shirasu-Hiza M, Canman JC. CYK-4 regulates Rac, but not Rho, during cytokinesis. *Mol Biol Cell*. 2017;28(9):1258-70.
31. Carmena M, Wheelock M, Funabiki H, Earnshaw WC. The chromosomal passenger complex (CPC): from easy rider to the godfather of mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(12):789-803.
32. Tatsumoto T, Xie X, Blumenthal R, Okamoto I, Miki T. Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol*. 1999;147(5):921-8.
33. Brennan IM, Peters U, Kapoor TM, Straight AF. Polo-like kinase controls vertebrate spindle elongation and cytokinesis. *PLoS ONE*. 2007;2(5):e409.
34. Burkard ME, Maciejowski J, Rodriguez-Bravo V, Repka M, Lowery DM, Clauser KR, et al. Plk1 self-organization and priming phosphorylation of HsCYK-4 at the spindle midzone regulate the onset of division in human cells. *PLoS Biol*. 2009;7(5):e1000111.
35. Prokopenko SN, Brumby A, O'Keefe L, Prior L, He Y, Saint R, et al. A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in *Drosophila*. *Genes Dev*. 1999;13(17):2301-14.
36. Somers WG, Saint R. 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):29-39.
37. Zavortink M, Contreras N, Addy T, Bejsovec A, Saint R. Tum/RacGAP50C provides a critical link between anaphase microtubules and the assembly of the contractile ring in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 22):5381-92.
38. Canman JC, Lewellyn L, Laband K, Smerdon SJ, Desai A, Bowerman B, et al. Inhibition of Rac by the GAP activity of centralspindlin is essential for cytokinesis. *Science*. 2008;322(5907):1543-6.
39. Loria A, Longhini KM, Glotzer M. The RhoGAP domain of CYK-4 has an essential role in RhoA activation. *Curr Biol*. 2012;22(3):213-9.
40. D'Avino PP, Savoian MS, Glover DM. Mutations in sticky lead to defective organization of the contractile ring during cytokinesis and are enhanced by Rho and suppressed by Rac. *J Cell Biol*. 2004;166(1):61-71.



41. Chircop M. Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases*. 2014;5.
42. Mikawa M, Su L, Parsons SJ. Opposing roles of p190RhoGAP and Ect2 RhoGEF in regulating cytokinesis. *Cell Cycle*. 2008;7(13):2003-12.
43. Zanin E, Desai A, Poser I, Toyoda Y, Andree C, Moebius C, et al. A conserved RhoGAP limits M phase contractility and coordinates with microtubule asters to confine RhoA during cytokinesis. *Dev Cell*. 2013;26(5):496-510.
44. Castrillon DH, Wasserman SA. Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development*. 1994;120(12):3367-77.
45. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(6):446-56.
46. Hickson GR, O'Farrell PH. Rho-dependent control of anillin behavior during cytokinesis. *J Cell Biol*. 2008;180(2):285-94.
47. Hickson GR, O'Farrell PH. Anillin: a pivotal organizer of the cytokinetic machinery. *Biochem Soc Trans*. 2008;36(Pt 3):439-41.
48. Kechad A, Jananji S, Ruella Y, Hickson GR. Anillin acts as a bifunctional linker coordinating midbody ring biogenesis during cytokinesis. *Curr Biol*. 2012;22(3):197-203.
49. Kachaner D, Pinson X, El Kadhi KB, Normandin K, Talje L, Lavoie H, et al. Interdomain allosteric regulation of Polo kinase by Aurora B and Map205 is required for cytokinesis. *J Cell Biol*. 2014;207(2):201-11.
50. D'Avino PP. How to scaffold the contractile ring for a safe cytokinesis - lessons from Anillin-related proteins. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 8):1071-9.
51. Cauvin C, Echard A. Phosphoinositides: Lipids with informative heads and mastermind functions in cell division. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(6):832-43.
52. Fishkind DJ, Wang YL. Orientation and three-dimensional organization of actin filaments in dividing cultured cells. *J Cell Biol*. 1993;123(4):837-48.
53. Ma X, Kovacs M, Conti MA, Wang A, Zhang Y, Sellers JR, et al. Nonmuscle myosin II exerts tension but does not translocate actin in vertebrate cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(12):4509-14.

54. Dambournet D, Machicoane M, Chesneau L, Sachse M, Rocancourt M, El Marjou A, et al. Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol.* 2011;13(8):981-8.
55. D'Avino PP, Savoian MS, Glover DM. Cleavage furrow formation and ingression during animal cytokinesis: a microtubule legacy. *J Cell Sci.* 2005;118(Pt 8):1549-58.
56. Chen W, Foss M, Tseng KF, Zhang D. Redundant mechanisms recruit actin into the contractile ring in silkworm spermatocytes. *PLoS Biol.* 2008;6(9):e209.
57. Werner M, Munro E, Glotzer M. Astral signals spatially bias cortical myosin recruitment to break symmetry and promote cytokinesis. *Curr Biol.* 2007;17(15):1286-97.
58. Nishimura Y, Yonemura S. Centralspindlin regulates ECT2 and RhoA accumulation at the equatorial cortex during cytokinesis. *J Cell Sci.* 2006;119(Pt 1):104-14.
59. Field SJ, Madson N, Kerr ML, Galbraith KA, Kennedy CE, Tahiliani M, et al. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> functions at the cleavage furrow during cytokinesis. *Curr Biol.* 2005;15(15):1407-12.
60. Emoto K, Inadome H, Kanaho Y, Narumiya S, Umeda M. Local change in phospholipid composition at the cleavage furrow is essential for completion of cytokinesis. *J Biol Chem.* 2005;280(45):37901-7.
61. Roubinet C, Decelle B, Chicanne G, Dorn JF, Payrastra B, Payre F, et al. Molecular networks linked by Moesin drive remodeling of the cell cortex during mitosis. *J Cell Biol.* 2011;195(1):99-112.
62. Echard A. Phosphoinositides and cytokinesis: the "PIP" of the iceberg. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2012;69(11):893-912.
63. Vicinanza M, D'Angelo G, Di Campli A, De Matteis MA. Function and dysfunction of the PI system in membrane trafficking. *EMBO J.* 2008;27(19):2457-70.
64. Vicinanza M, D'Angelo G, Di Campli A, De Matteis MA. Phosphoinositides as regulators of membrane trafficking in health and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(18):2833-41.
65. Balla T, Szentpetery Z, Kim YJ. Phosphoinositide signaling: new tools and insights. *Physiology (Bethesda).* 2009;24:231-44.
66. Liu Y, Bankaitis VA. Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Prog Lipid Res.* 2010;49(3):201-17.

67. Balla T, Wymann M, York JD, SpringerLink (Service en ligne). Phosphoinositides I enzymes of synthesis and degradation. Dordrecht ; New York: Springer; 2012. 1 texte électronique p.
68. Balla T. Phosphoinositides: tiny lipids with giant impact on cell regulation. *Physiol Rev.* 2013;93(3):1019-137.
69. Islam MS, SpringerLink (Service en ligne). Calcium signaling. Dordrecht ; New York: Springer; 2012. 1 texte électronique p.
70. Falasca M, SpringerLink (Service en ligne). Phosphoinositides and Disease. Dordrecht: Springer Netherlands : Imprint: Springer; 2012. 1 texte électronique p.
71. Heo WD, Inoue T, Park WS, Kim ML, Park BO, Wandless TJ, et al. PI(3,4,5)P<sub>3</sub> and PI(4,5)P<sub>2</sub> lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science.* 2006;314(5804):1458-61.
72. Frenette P, Haines E, Loloyan M, Kinal M, Pakarian P, Piekny A. An anillin-Ect2 complex stabilizes central spindle microtubules at the cortex during cytokinesis. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e34888.
73. Abe M, Makino A, Hullin-Matsuda F, Kamijo K, Ohno-Iwashita Y, Hanada K, et al. A role for sphingomyelin-rich lipid domains in the accumulation of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate to the cleavage furrow during cytokinesis. *Mol Cell Biol.* 2012;32(8):1396-407.
74. Su KC, Takaki T, Petronczki M. Targeting of the RhoGEF Ect2 to the equatorial membrane controls cleavage furrow formation during cytokinesis. *Dev Cell.* 2011;21(6):1104-15.
75. Piekny AJ, Maddox AS. The myriad roles of Anillin during cytokinesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21(9):881-91.
76. Liu J, Fairn GD, Ceccarelli DF, Sicheri F, Wilde A. Cleavage furrow organization requires PIP(2)-mediated recruitment of anillin. *Curr Biol.* 2012;22(1):64-9.
77. Solinet S, Mahmud K, Stewman SF, Ben El Kadhi K, Decelle B, Talje L, et al. The actin-binding ERM protein Moesin binds to and stabilizes microtubules at the cell cortex. *J Cell Biol.* 2013;202(2):251-60.
78. Carreno S, Kouranti I, Glusman ES, Fuller MT, Echard A, Payre F. Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J Cell Biol.* 2008;180(4):739-46.

79. Fehon RG, McClatchey AI, Bretscher A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(4):276-87.
80. Lekomtsev S, Su KC, Pye VE, Blight K, Sundaramoorthy S, Takaki T, et al. Centralspindlin links the mitotic spindle to the plasma membrane during cytokinesis. *Nature.* 2012;492(7428):276-9.
81. Saarikangas J, Zhao H, Lappalainen P. Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev.* 2010;90(1):259-89.
82. Zhang L, Mao YS, Janmey PA, Yin HL. Phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate and the actin cytoskeleton. *Subcell Biochem.* 2012;59:177-215.
83. Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL. Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J Biol Chem.* 1999;274(47):33179-82.
84. Pollard TD. Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2007;36:451-77.
85. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(11):6181-6.
86. Bamberg JR. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1999;15:185-230.
87. van Rheenen J, Song X, van Roosmalen W, Cammer M, Chen X, Desmarais V, et al. EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells. *J Cell Biol.* 2007;179(6):1247-59.
88. Gericke A, Leslie NR, Losche M, Ross AH. PtdIns(4,5)P2-mediated cell signaling: emerging principles and PTEN as a paradigm for regulatory mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 2013;991:85-104.
89. Vines CM. Phospholipase C. *Adv Exp Med Biol.* 2012;740:235-54.
90. Kadamur G, Ross EM. Mammalian phospholipase C. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:127-54.
91. Gresset A, Sondek J, Harden TK. The phospholipase C isozymes and their regulation. *Subcell Biochem.* 2012;58:61-94.
92. Suh PG, Park JI, Manzoli L, Cocco L, Peak JC, Katan M, et al. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Rep.* 2008;41(6):415-34.

93. Schnabel P, Camps M. Activation of a phospholipase C $\beta$ 2 deletion mutant by limited proteolysis. *Biochem J.* 1998;330 ( Pt 1):461-8.
94. Hicks SN, Jezyk MR, Gershburg S, Seifert JP, Harden TK, Sondek J. General and versatile autoinhibition of PLC isozymes. *Mol Cell.* 2008;31(3):383-94.
95. Gresset A, Hicks SN, Harden TK, Sondek J. Mechanism of phosphorylation-induced activation of phospholipase C- $\gamma$  isozymes. *J Biol Chem.* 2010;285(46):35836-47.
96. Ellis MV, U S, Katan M. Mutations within a highly conserved sequence present in the X region of phosphoinositide-specific phospholipase C- $\delta$  1. *Biochem J.* 1995;307 ( Pt 1):69-75.
97. Stahelin RV, Scott JL, Frick CT. Cellular and molecular interactions of phosphoinositides and peripheral proteins. *Chem Phys Lipids.* 2014;182:3-18.
98. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275(5308):1943-7.
99. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 1997;15(4):356-62.
100. Worby CA, Dixon JE. Pten. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:641-69.
101. Song MS, Salmena L, Pandolfi PP. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(5):283-96.
102. Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, Cordon-Cardo C, Elkon KB, Pandolfi PP. Impaired Fas response and autoimmunity in Pten $^{+/-}$  mice. *Science.* 1999;285(5436):2122-5.
103. Di Cristofano A, De Acetis M, Koff A, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nat Genet.* 2001;27(2):222-4.
104. Shi Y, Paluch BE, Wang X, Jiang X. PTEN at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 20):4687-92.
105. Gil A, Rodriguez-Escudero I, Stumpf M, Molina M, Cid VJ, Pulido R. A functional dissection of PTEN N-terminus: implications in PTEN subcellular targeting and tumor suppressor activity. *PLoS ONE.* 2015;10(4):e0119287.

106. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 1998;273(22):13375-8.
107. Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol.* 1999;9(4):125-8.
108. Pulido R, Baker SJ, Barata JT, Carracedo A, Cid VJ, Chin-Sang ID, et al. A unified nomenclature and amino acid numbering for human PTEN. *Sci Signal.* 2014;7(332):pe15.
109. McConnachie G, Pass I, Walker SM, Downes CP. Interfacial kinetic analysis of the tumour suppressor phosphatase, PTEN: evidence for activation by anionic phospholipids. *Biochem J.* 2003;371(Pt 3):947-55.
110. Walker SM, Leslie NR, Perera NM, Batty IH, Downes CP. The tumour-suppressor function of PTEN requires an N-terminal lipid-binding motif. *Biochem J.* 2004;379(Pt 2):301-7.
111. Iijima M, Huang YE, Luo HR, Vazquez F, Devreotes PN. Novel mechanism of PTEN regulation by its phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding motif is critical for chemotaxis. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16606-13.
112. Campbell RB, Liu F, Ross AH. Allosteric activation of PTEN phosphatase by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem.* 2003;278(36):33617-20.
113. Torres J, Rodriguez J, Myers MP, Valiente M, Graves JD, Tonks NK, et al. Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions. *J Biol Chem.* 2003;278(33):30652-60.
114. Gil A, Andres-Pons A, Fernandez E, Valiente M, Torres J, Cervera J, et al. Nuclear localization of PTEN by a Ran-dependent mechanism enhances apoptosis: Involvement of an N-terminal nuclear localization domain and multiple nuclear exclusion motifs. *Mol Biol Cell.* 2006;17(9):4002-13.
115. Gil A, Andres-Pons A, Pulido R. Nuclear PTEN: a tale of many tails. *Cell Death Differ.* 2007;14(3):395-9.
116. Trotman LC, Wang X, Alimonti A, Chen Z, Teruya-Feldstein J, Yang H, et al. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell.* 2007;128(1):141-56.

117. Wang X, Trotman LC, Koppie T, Alimonti A, Chen Z, Gao Z, et al. NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN. *Cell*. 2007;128(1):129-39.
118. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, et al. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(17):9052-7.
119. Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res*. 1997;57(11):2124-9.
120. Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998;95(1):29-39.
121. Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, et al. PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(11):6199-204.
122. Cho W, Stahelin RV. Membrane binding and subcellular targeting of C2 domains. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(8):838-49.
123. Das S, Dixon JE, Cho W. Membrane-binding and activation mechanism of PTEN. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7491-6.
124. Nowak DG, Trotman LC. PTEN. In: Neel BG, Tonks NK, editors. *Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer*: Springer; 2016. p. 233-46.
125. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302(5651):1704-9.
126. Mitchell F. Diabetes: PTEN mutations increase insulin sensitivity and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(12):698.
127. Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci*. 2008;121(Pt 3):249-53.
128. Lindsay Y, McCoull D, Davidson L, Leslie NR, Fairservice A, Gray A, et al. Localization of agonist-sensitive PtdIns(3,4,5)P3 reveals a nuclear pool that is insensitive to PTEN expression. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 24):5160-8.
129. Ho J, Bassi C, Stambolic V. Characterization of nuclear PTEN and its post translational modifications. *Methods*. 2015;77-78:104-11.

130. papa A, Pandolfi PP. Phosphatase-independent functions of the tumor suppressor PTEN. In: Neel BG, Tonks NK, editors. *Protein Tyrosine Phosphatases in Cancer*: Springer; 2016. p. 247-60.
131. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*. 2007;128(1):157-70.
132. Chung JH, Ginn-Pease ME, Eng C. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. *Cancer Res*. 2005;65(10):4108-16.
133. Liu F, Wagner S, Campbell RB, Nickerson JA, Schiffer CA, Ross AH. PTEN enters the nucleus by diffusion. *J Cell Biochem*. 2005;96(2):221-34.
134. Mehta ZB, Pietka G, Lowe M. The cellular and physiological functions of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic*. 2014;15(5):471-87.
135. Lowe M. Structure and function of the Lowe syndrome protein OCRL1. *Traffic*. 2005;6(9):711-9.
136. Bokenkamp A, Ludwig M. The oculocerebrorenal syndrome of Lowe: an update. *Pediatr Nephrol*. 2016;31(12):2201-12.
137. Ooms LM, Horan KA, Rahman P, Seaton G, Gurung R, Kethesparan DS, et al. The role of the inositol polyphosphate 5-phosphatases in cellular function and human disease. *Biochem J*. 2009;419(1):29-49.
138. Jefferson AB, Majerus PW. Properties of type II inositol polyphosphate 5-phosphatase. *J Biol Chem*. 1995;270(16):9370-7.
139. Janne PA, Suchy SF, Bernard D, MacDonald M, Crawley J, Grinberg A, et al. Functional overlap between murine Inpp5b and Ocr11 may explain why deficiency of the murine ortholog for OCRL1 does not cause Lowe syndrome in mice. *J Clin Invest*. 1998;101(10):2042-53.
140. Choudhury R, Noakes CJ, McKenzie E, Kox C, Lowe M. Differential clathrin binding and subcellular localization of OCRL1 splice isoforms. *J Biol Chem*. 2009;284(15):9965-73.
141. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, et al. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*. 2003;302(5653):2141-4.



142. Pirruccello M, De Camilli P. Inositol 5-phosphatases: insights from the Lowe syndrome protein OCRL. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(4):134-43.
143. Mao Y, Balkin DM, Zoncu R, Erdmann KS, Tomasini L, Hu F, et al. A PH domain within OCRL bridges clathrin-mediated membrane trafficking to phosphoinositide metabolism. *EMBO J.* 2009;28(13):1831-42.
144. Pirruccello M, Nandez R, Idevall-Hagren O, Alcazar-Roman A, Abriola L, Berwick SA, et al. Identification of inhibitors of inositol 5-phosphatases through multiple screening strategies. *ACS Chem Biol.* 2014;9(6):1359-68.
145. Pirruccello M, Swan LE, Folta-Stogniew E, De Camilli P. Recognition of the F&H motif by the Lowe syndrome protein OCRL. *Nat Struct Mol Biol.* 2011;18(7):789-95.
146. Boucrot E, McMahon HT. [Nucleation of clathrin-coated pits - << membrane sculptors >> at work]. *Med Sci (Paris).* 2011;27(2):122-5.
147. Zhang X, Jefferson AB, Auethavekiat V, Majerus PW. The protein deficient in Lowe syndrome is a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(11):4853-6.
148. Zhang X, Hartz PA, Philip E, Racusen LC, Majerus PW. 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.* 1998;273(3):1574-82.
149. Schmid AC, Wise HM, Mitchell CA, Nussbaum R, Woscholski R. Type II phosphoinositide 5-phosphatases have unique sensitivities towards fatty acid composition and head group phosphorylation. *FEBS Lett.* 2004;576(1-2):9-13.
150. Ponting CP. A novel domain suggests a ciliary function for ASPM, a brain size determining gene. *Bioinformatics.* 2006;22(9):1031-5.
151. Hyvola N, Diao A, McKenzie E, Skippen A, Cockcroft S, Lowe M. Membrane targeting and activation of the Lowe syndrome protein OCRL1 by rab GTPases. *EMBO J.* 2006;25(16):3750-61.
152. Gillingham AK, Sinka R, Torres IL, Lilley KS, Munro S. Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Dev Cell.* 2014;31(3):358-73.
153. Fukuda M, Kanno E, Ishibashi K, Itoh T. Large scale screening for novel rab effectors reveals unexpected broad Rab binding specificity. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(6):1031-42.

154. Rodriguez-Gabin AG, Ortiz E, Demoliner K, Si Q, Almazan G, Larocca JN. Interaction of Rab31 and OCRL-1 in oligodendrocytes: its role in transport of mannose 6-phosphate receptors. *J Neurosci Res.* 2010;88(3):589-604.
155. Peck J, Douglas Gt, Wu CH, Burbelo PD. Human RhoGAP domain-containing proteins: structure, function and evolutionary relationships. *FEBS Lett.* 2002;528(1-3):27-34.
156. Faucherre A, Desbois P, Satre V, Lunardi J, Dorseuil O, Gacon G. Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with Rac GTPase in the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet.* 2003;12(19):2449-56.
157. Erdmann KS, Mao Y, McCrea HJ, Zoncu R, Lee S, Paradise S, et al. A role of the Lowe syndrome protein OCRL in early steps of the endocytic pathway. *Dev Cell.* 2007;13(3):377-90.
158. Ungewickell A, Ward ME, Ungewickell E, Majerus PW. The inositol polyphosphate 5-phosphatase Ocr1 associates with endosomes that are partially coated with clathrin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(37):13501-6.
159. Choudhury R, Diao A, Zhang F, Eisenberg E, Saint-Pol A, Williams C, et al. Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with clathrin and regulates protein trafficking between endosomes and the trans-Golgi network. *Mol Biol Cell.* 2005;16(8):3467-79.
160. Noakes CJ, Lee G, Lowe M. The PH domain proteins IPIP27A and B link OCRL1 to receptor recycling in the endocytic pathway. *Mol Biol Cell.* 2011;22(5):606-23.
161. Swan LE, Tomasini L, Pirruccello M, Lunardi J, De Camilli P. Two closely related endocytic proteins that share a common OCRL-binding motif with APPL1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3511-6.
162. Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, et al. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell.* 2004;116(3):445-56.
163. Vicinanza M, Di Campli A, Polishchuk E, Santoro M, Di Tullio G, Godi A, et al. OCRL controls trafficking through early endosomes via PtdIns4,5P(2)-dependent regulation of endosomal actin. *EMBO J.* 2011;30(24):4970-85.
164. Suchy SF, Nussbaum RL. The deficiency of PIP2 5-phosphatase in Lowe syndrome affects actin polymerization. *Am J Hum Genet.* 2002;71(6):1420-7.

165. Cui S, Guerriero CJ, Szalinski CM, Kinlough CL, Hughey RP, Weisz OA. OCRL1 function in renal epithelial membrane traffic. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2010;298(2):F335-45.
166. van Rahden VA, Brand K, Najm J, Heeren J, Pfeffer SR, Braulke T, et al. The 5-phosphatase OCRL mediates retrograde transport of the mannose 6-phosphate receptor by regulating a Rac1-cofilin signalling module. *Hum Mol Genet*. 2012;21(23):5019-38.
167. Cauvin C, Rosendale M, Gupta-Rossi N, Rocancourt M, Larraufie P, Salomon R, et al. Rab35 GTPase Triggers Switch-like Recruitment of the Lowe Syndrome Lipid Phosphatase OCRL on Newborn Endosomes. *Curr Biol*. 2016;26(1):120-8.
168. Olivos-Glander IM, Janne PA, Nussbaum RL. The oculocerebrorenal syndrome gene product is a 105-kD protein localized to the Golgi complex. *Am J Hum Genet*. 1995;57(4):817-23.
169. Dressman MA, Olivos-Glander IM, Nussbaum RL, Suchy SF. Ocr11, a PtdIns(4,5)P(2) 5-phosphatase, is localized to the trans-Golgi network of fibroblasts and epithelial cells. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(2):179-90.
170. Rodriguez-Gabin AG, Cammer M, Almazan G, Charron M, Larocca JN. Role of rRAB22b, an oligodendrocyte protein, in regulation of transport of vesicles from trans Golgi to endocytic compartments. *J Neurosci Res*. 2001;66(6):1149-60.
171. Oltrabella F, Pietka G, Ramirez IB, Mironov A, Starborg T, Drummond IA, et al. The Lowe syndrome protein OCRL1 is required for endocytosis in the zebrafish pronephric tubule. *PLoS Genet*. 2015;11(4):e1005058.
172. Balla T, Wymann M, York JD, SpringerLink (Service en ligne). Phosphoinositides II the diverse biological functions. Dordrecht ; New York: Springer; 2012. 1 texte électronique p.
173. Mayinger P. Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821(8):1104-13.
174. Watt SA, Kular G, Fleming IN, Downes CP, Lucocq JM. Subcellular localization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate using the pleckstrin homology domain of phospholipase C delta1. *Biochem J*. 2002;363(Pt 3):657-66.
175. Graham TR, Burd CG. Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends Cell Biol*. 2011;21(2):113-21.

176. Behnia R, Munro S. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*. 2005;438(7068):597-604.
177. Faucherre A, Desbois P, Nagano F, Satre V, Lunardi J, Gacon G, et al. Lowe syndrome protein Ocr11 is translocated to membrane ruffles upon Rac GTPase activation: a new perspective on Lowe syndrome pathophysiology. *Hum Mol Genet*. 2005;14(11):1441-8.
178. Coon BG, Mukherjee D, Hanna CB, Riese DJ, 2nd, Lowe M, Aguilar RC. Lowe syndrome patient fibroblasts display Ocr11-specific cell migration defects that cannot be rescued by the homologous Inpp5b phosphatase. *Hum Mol Genet*. 2009;18(23):4478-91.
179. Choi S, Thapa N, Tan X, Hedman AC, Anderson RA. PIP kinases define PI4,5P(2) signaling specificity by association with effectors. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(6):711-23.
180. Palamidessi A, Frittoli E, Garre M, Faretta M, Mione M, Testa I, et al. Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell*. 2008;134(1):135-47.
181. Conduit SE, Dyson JM, Mitchell CA. Inositol polyphosphate 5-phosphatases; new players in the regulation of cilia and ciliopathies. *FEBS Lett*. 2012;586(18):2846-57.
182. Malicki JJ, Johnson CA. The Cilium: Cellular Antenna and Central Processing Unit. *Trends Cell Biol*. 2017;27(2):126-40.
183. Rbaibi Y, Cui S, Mo D, Carattino M, Rohatgi R, Satlin LM, et al. OCRL1 modulates cilia length in renal epithelial cells. *Traffic*. 2012;13(9):1295-305.
184. Luo N, West CC, Murga-Zamalloa CA, Sun L, Anderson RM, Wells CD, et al. OCRL localizes to the primary cilium: a new role for cilia in Lowe syndrome. *Hum Mol Genet*. 2012;21(15):3333-44.
185. Coon BG, Hernandez V, Madhivanan K, Mukherjee D, Hanna CB, Barinaga-Rementería Ramirez I, et al. The Lowe syndrome protein OCRL1 is involved in primary cilia assembly. *Hum Mol Genet*. 2012;21(8):1835-47.
186. Luo N, Kumar A, Conwell M, Weinreb RN, Anderson R, Sun Y. Compensatory Role of Inositol 5-Phosphatase INPP5B to OCRL in Primary Cilia Formation in Oculocerebrorenal Syndrome of Lowe. *PLoS ONE*. 2013;8(6):e66727.

187. Loovers HM, Kortholt A, de Groote H, Whitty L, Nussbaum RL, van Haastert PJ. Regulation of phagocytosis in *Dictyostelium* by the inositol 5-phosphatase OCRL homolog Dd5P4. *Traffic*. 2007;8(5):618-28.
188. Bohdanowicz M, Balkin DM, De Camilli P, Grinstein S. Recruitment of OCRL and Inpp5B to phagosomes by Rab5 and APPL1 depletes phosphoinositides and attenuates Akt signaling. *Mol Biol Cell*. 2012;23(1):176-87.
189. Marion S, Mazzolini J, Herit F, Bourdoncle P, Kambou-Pene N, Hailfinger S, et al. The NF-kappaB signaling protein Bcl10 regulates actin dynamics by controlling AP1 and OCRL-bearing vesicles. *Dev Cell*. 2012;23(5):954-67.
190. Scott CC, Dobson W, Botelho RJ, Coady-Osberg N, Chavrier P, Knecht DA, et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J Cell Biol*. 2005;169(1):139-49.
191. Kuhbacher A, Dambournet D, Echard A, Cossart P, Pizarro-Cerda J. Phosphatidylinositol 5-phosphatase oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein (OCRL) controls actin dynamics during early steps of *Listeria monocytogenes* infection. *J Biol Chem*. 2012;287(16):13128-36.
192. Sarantis H, Balkin DM, De Camilli P, Isberg RR, Brumell JH, Grinstein S. *Yersinia* entry into host cells requires Rab5-dependent dephosphorylation of PI(4,5)P(2) and membrane scission. *Cell Host Microbe*. 2012;11(2):117-28.
193. Ben El Kadhi K, Emery G, Carreno S. The unexpected role of *Drosophila* OCRL during cytokinesis. *Commun Integr Biol*. 2012;5(3):291-3.
194. Ben El Kadhi K, Roubinet C, Solinet S, Emery G, Carreno S. The inositol 5-phosphatase dOCRL controls PI(4,5)P2 homeostasis and is necessary for cytokinesis. *Curr Biol*. 2011;21(12):1074-9.
195. Loi M. Lowe syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2006;1:16.
196. Lowe CU, Terrey M, Mac LE. Organic-aciduria, decreased renal ammonia production, hydrophthalmos, and mental retardation; a clinical entity. *AMA Am J Dis Child*. 1952;83(2):164-84.
197. Richards W, Donnell GN, Wilson WA, Stowens D, Perry T. The Oculo-Cerebro-Renal Syndrome of Lowe. *Am J Dis Child*. 1965;109:185-203.

198. Cau M, Addis M, Congiu R, Meloni C, Cao A, Santaniello S, et al. A locus for familial skewed X chromosome inactivation maps to chromosome Xq25 in a family with a female manifesting Lowe syndrome. *J Hum Genet.* 2006;51(11):1030-6.
199. Hodgson SV, Heckmatt JZ, Hughes E, Crolla JA, Dubowitz V, Bobrow M. A balanced de novo X/autosome translocation in a girl with manifestations of Lowe syndrome. *Am J Med Genet.* 1986;23(3):837-47.
200. Mueller OT, Hartsfield JK, Jr., Gallardo LA, Essig YP, Miller KL, Papenhausen PR, et al. Lowe oculocerebrorenal syndrome in a female with a balanced X;20 translocation: mapping of the X chromosome breakpoint. *Am J Hum Genet.* 1991;49(4):804-10.
201. Attree O, Olivos IM, Okabe I, Bailey LC, Nelson DL, Lewis RA, et al. The Lowe's oculocerebrorenal syndrome gene encodes a protein highly homologous to inositol polyphosphate-5-phosphatase. *Nature.* 1992;358(6383):239-42.
202. Nussbaum RL, Orrison BM, Janne PA, Charnas L, Chinault AC. Physical mapping and genomic structure of the Lowe syndrome gene OCRL1. *Hum Genet.* 1997;99(2):145-50.
203. Hichri H, Rendu J, Monnier N, Coutton C, Dorseuil O, Poussou RV, et al. From Lowe syndrome to Dent disease: correlations between mutations of the OCRL1 gene and clinical and biochemical phenotypes. *Hum Mutat.* 2011;32(4):379-88.
204. Monnier N, Satre V, Lerouge E, Berthoin F, Lunardi J. OCRL1 mutation analysis in French Lowe syndrome patients: implications for molecular diagnosis strategy and genetic counseling. *Hum Mutat.* 2000;16(2):157-65.
205. Bockenbauer D, Bokenkamp A, van't Hoff W, Levtchenko E, Kist-van Holthe JE, Tasic V, et al. Renal phenotype in Lowe Syndrome: a selective proximal tubular dysfunction. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(5):1430-6.
206. Lin T, Orrison BM, Suchy SF, Lewis RA, Nussbaum RL. Mutations are not uniformly distributed throughout the OCRL1 gene in Lowe syndrome patients. *Mol Genet Metab.* 1998;64(1):58-61.
207. Pasternack SM, Bockenbauer D, Refke M, Tasic V, Draaken M, Conrad C, et al. A premature termination mutation in a patient with Lowe syndrome without congenital cataracts: dropping the "O" in OCRL. *Klin Padiatr.* 2013;225(1):29-33.
208. Addis M, Loi M, Lepiani C, Cau M, Melis MA. OCRL mutation analysis in Italian patients with Lowe syndrome. *Hum Mutat.* 2004;23(5):524-5.

209. Chabaa L, Monnier N, Dahri S, Jorio M, Lunardi J, Chabraoui L. [Oculo-cerebro-renal Lowe syndrome: clinical, biochemical and molecular studies in a Moroccan patient]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2006;64(1):53-9.
210. Sethi SK, Bagga A, Gulati A, Hari P, Gupta N, Lunardi J. Mutations in OCRL1 gene in Indian children with Lowe syndrome. *Clin Exp Nephrol*. 2008;12(5):358-62.
211. Kawano T, Indo Y, Nakazato H, Shimadzu M, Matsuda I. Oculocerebrorenal syndrome of Lowe: three mutations in the OCRL1 gene derived from three patients with different phenotypes. *Am J Med Genet*. 1998;77(5):348-55.
212. Kubota T, Sakurai A, Arakawa K, Shimazu M, Wakui K, Furihata K, et al. Identification of two novel mutations in the OCRL1 gene in Japanese families with Lowe syndrome. *Clin Genet*. 1998;54(3):199-202.
213. Satre V, Monnier N, Berthoin F, Ayuso C, Joannard A, Jouk PS, et al. Characterization of a germline mosaicism in families with Lowe syndrome, and identification of seven novel mutations in the OCRL1 gene. *Am J Hum Genet*. 1999;65(1):68-76.
214. Tosetto E, Addis M, Caridi G, Meloni C, Emma F, Vergine G, et al. Locus heterogeneity of Dent's disease: OCRL1 and TMEM27 genes in patients with no CLCN5 mutations. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(10):1967-73.
215. Shrimpton AE, Hoopes RR, Jr., Knohl SJ, Hueber P, Reed AA, Christie PT, et al. OCRL1 mutations in Dent 2 patients suggest a mechanism for phenotypic variability. *Nephron Physiol*. 2009;112(2):p27-36.
216. Cho HY, Lee BH, Choi HJ, Ha IS, Choi Y, Cheong HI. Renal manifestations of Dent disease and Lowe syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(2):243-9.
217. Utsch B, Bokenkamp A, Benz MR, Besbas N, Dotsch J, Franke I, et al. Novel OCRL1 mutations in patients with the phenotype of Dent disease. *Am J Kidney Dis*. 2006;48(6):942 e1-14.
218. Ke YH, He JW, Fu WZ, Zhang ZL. Identification of two novel mutations in the OCRL1 gene in two Chinese families with Lowe syndrome. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(1):20-5.
219. Hoopes RR, Jr., Shrimpton AE, Knohl SJ, Hueber P, Hoppe B, Matyus J, et al. Dent Disease with mutations in OCRL1. *Am J Hum Genet*. 2005;76(2):260-7.

220. Chou YY, Chao SC, Chiou YY, Lin SJ. Identification of OCRL1 mutations in two Taiwanese Lowe syndrome patients. *Acta Paediatr Taiwan*. 2005;46(4):226-9.
221. Simsek E, Simsek T, Dallar Y, Can O, Willems PJ. A novel pathogenic DNA variation in the OCRL1 gene in Lowe syndrome. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2011;3(1):29-31.
222. Roschinger W, Muntau AC, Rudolph G, Roscher AA, Kammerer S. Carrier assessment in families with lowe oculocerebrorenal syndrome: novel mutations in the OCRL1 gene and correlation of direct DNA diagnosis with ocular examination. *Mol Genet Metab*. 2000;69(3):213-22.
223. Yuksel A, Karaca E, Albayram MS. Magnetic resonance imaging, magnetic resonance spectroscopy, and facial dysmorphism in a case of Lowe syndrome with novel OCRL1 gene mutation. *J Child Neurol*. 2009;24(1):93-6.
224. Leahey AM, Charnas LR, Nussbaum RL. Nonsense mutations in the OCRL-1 gene in patients with the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. *Hum Mol Genet*. 1993;2(4):461-3.
225. Schramm L, Gal A, Zimmermann J, Netzer KO, Heidbreder E, Lopau K, et al. Advanced renal insufficiency in a 34-year-old man with Lowe syndrome. *Am J Kidney Dis*. 2004;43(3):538-43.
226. Tripathi RC, Cibis GW, Tripathi BJ. Pathogenesis of cataracts in patients with Lowe's syndrome. *Ophthalmology*. 1986;93(8):1046-51.
227. orphanet. Le syndrome de Lowe 2014 [Available from: [https://www.orpha.net/data/patho/Han/fr/Handicap\\_Lowe-FrfrPub123.pdf](https://www.orpha.net/data/patho/Han/fr/Handicap_Lowe-FrfrPub123.pdf)].
228. Kohyama J, Niimura F, Kawashima K, Iwakawa Y, Nonaka I. Congenital fiber type disproportion myopathy in Lowe syndrome. *Pediatr Neurol*. 1989;5(6):373-6.
229. Schneider JF, Boltshauser E, Neuhaus TJ, Rauscher C, Martin E. MRI and proton spectroscopy in Lowe syndrome. *Neuropediatrics*. 2001;32(1):45-8.
230. Verroust PJ, Kozyraki R. [Cubilin: physiopathologic role and relationship with megalin]. *Med Sci (Paris)*. 2003;19(3):337-43.
231. Wu G, Zhang W, Na T, Jing H, Wu H, Peng JB. Suppression of intestinal calcium entry channel TRPV6 by OCRL, a lipid phosphatase associated with Lowe syndrome and Dent disease. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302(10):C1479-91.



232. Thyagarajan B, Lukacs V, Rohacs T. Hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates calcium-induced inactivation of TRPV6 channels. *J Biol Chem.* 2008;283(22):14980-7.
233. Ruellas AC, Pithon MM, Oliveira DD, Oliveira AM. Lowe syndrome: literature review and case report. *J Orthod.* 2008;35(3):156-60.
234. Takeda T, Robinson IM, Savoian MM, Griffiths JR, Whetton AD, McMahon HT, et al. Drosophila F-BAR protein Syndapin contributes to coupling the plasma membrane and contractile ring in cytokinesis. *Open Biol.* 2013;3(8):130081.
235. Kouranti I, Sachse M, Arouche N, Goud B, Echard A. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol.* 2006;16(17):1719-25.
236. Yu X, Prekeris R, Gould GW. Role of endosomal Rab GTPases in cytokinesis. *Eur J Cell Biol.* 2007;86(1):25-35.
237. Ai E, Skop AR. Endosomal recycling regulation during cytokinesis. *Commun Integr Biol.* 2009;2(5):444-7.
238. Riehle RD, Cornea S, Degterev A. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in cell signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2013;991:105-39.
239. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1-222.
240. De Leo MG, Staiano L, Vicinanza M, Luciani A, Carissimo A, Mutarelli M, et al. Autophagosome-lysosome fusion triggers a lysosomal response mediated by TLR9 and controlled by OCRL. *Nat Cell Biol.* 2016;18(8):839-50.
241. Ravikumar B, Imarisio S, Sarkar S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Rab5 modulates aggregation and toxicity of mutant huntingtin through macroautophagy in cell and fly models of Huntington disease. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 10):1649-60.
242. Ao X, Zou L, Wu Y. Regulation of autophagy by the Rab GTPase network. *Cell Death Differ.* 2014;21(3):348-58.
243. Fang X, Zhou J, Liu W, Duan X, Gala U, Sandoval H, et al. Dynamin Regulates Autophagy by Modulating Lysosomal Function. *J Genet Genomics.* 2016;43(2):77-86.

244. Moreau K, Fleming A, Imarisio S, Lopez Ramirez A, Mercer JL, Jimenez-Sanchez M, et al. PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Commun.* 2014;5:4998.
245. Kruppa AJ, Kendrick-Jones J, Buss F. Myosins, Actin and Autophagy. *Traffic.* 2016;17(8):878-90.
246. Behl C. BAG3 and friends: co-chaperones in selective autophagy during aging and disease. *Autophagy.* 2011;7(7):795-8.
247. Crippa V, Sau D, Rusmini P, Boncoraglio A, Onesto E, Bolzoni E, et al. The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Hum Mol Genet.* 2010;19(17):3440-56.
248. Fuchs M, Luthold C, Guilbert SM, Varlet AA, Lambert H, Jette A, et al. A Role for the Chaperone Complex BAG3-HSPB8 in Actin Dynamics, Spindle Orientation and Proper Chromosome Segregation during Mitosis. *PLoS Genet.* 2015;11(10):e1005582.
249. Varlet AA, Fuchs M, Luthold C, Lambert H, Landry J, Lavoie JN. Fine-tuning of actin dynamics by the HSPB8-BAG3 chaperone complex facilitates cytokinesis and contributes to its impact on cell division. *Cell Stress Chaperones.* 2017;22(4):553-67.
250. Martens S, McMahon HT. C2 domains and membrane fusion. *Curr Top Membr.* 2011;68:141-59.
251. Martens S. Role of C2 domain proteins during synaptic vesicle exocytosis. *Biochem Soc Trans.* 2010;38(Pt 1):213-6.
252. Naguib A, Bencze G, Cho H, Zheng W, Tocilj A, Elkayam E, et al. PTEN functions by recruitment to cytoplasmic vesicles. *Mol Cell.* 2015;58(2):255-68.
253. Ktistakis NT, Tooze SA. PIPing on lysosome tubes. *EMBO J.* 2013;32(3):315-7.
254. Bunce MW, Bergendahl K, Anderson RA. Nuclear PI(4,5)P(2): a new place for an old signal. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(5-6):560-9.
255. Gellatly SA, Kalujnaia S, Cramb G. Cloning, tissue distribution and sub-cellular localisation of phospholipase C X-domain containing protein (PLCXD) isoforms. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;424(4):651-6.
256. Yim EK, Peng G, Dai H, Hu R, Li K, Lu Y, et al. Rak functions as a tumor suppressor by regulating PTEN protein stability and function. *Cancer Cell.* 2009;15(4):304-14.

257. Li Z, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, et al. Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol.* 2005;7(4):399-404.
258. Meili R, Sasaki AT, Firtel RA. Rho Rocks PTEN. *Nat Cell Biol.* 2005;7(4):334-5.
259. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(1):11-21.
260. Atilla-Gokcumen GE, Castoreno AB, Sasse S, Eggert US. Making the cut: the chemical biology of cytokinesis. *ACS Chem Biol.* 2010;5(1):79-90.
261. Webb SE, Li WM, Miller AL. Calcium signalling during the cleavage period of zebrafish development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2008;363(1495):1363-9.
262. Wong R, Hadjiyanni I, Wei HC, Polevoy G, McBride R, Sem KP, et al. PIP2 hydrolysis and calcium release are required for cytokinesis in *Drosophila* spermatocytes. *Curr Biol.* 2005;15(15):1401-6.
263. Mitsuyama F, Sawai T, Carafoli E, Furuichi T, Mikoshiba K. Microinjection of Ca<sup>2+</sup> store-enriched microsomes to dividing newt eggs induces extra-cleavage furrows via inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Dev Biol.* 1999;214(1):160-7.
264. Mayorga LS, Beron W, Sarrouf MN, Colombo MI, Creutz C, Stahl PD. Calcium-dependent fusion among endosomes. *J Biol Chem.* 1994;269(49):30927-34.
265. Medina DL, Di Paola S, Peluso I, Armani A, De Stefani D, Venditti R, et al. Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB. *Nat Cell Biol.* 2015;17(3):288-99.
266. Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene.* 2008;27 Suppl 1:S137-48.
267. Gao W, Ding WX, Stolz DB, Yin XM. Induction of macroautophagy by exogenously introduced calcium. *Autophagy.* 2008;4(6):754-61.
268. Harr MW, Distelhorst CW. Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010;2(10):a005579.
269. Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev.* 2000;80(4):1483-521.
270. Marks B, McMahon HT. Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Curr Biol.* 1998;8(13):740-9.

271. Dyson JM, Fedele CG, Davies EM, Becanovic J, Mitchell CA. Phosphoinositide phosphatases: just as important as the kinases. *Subcell Biochem.* 2012;58:215-79.

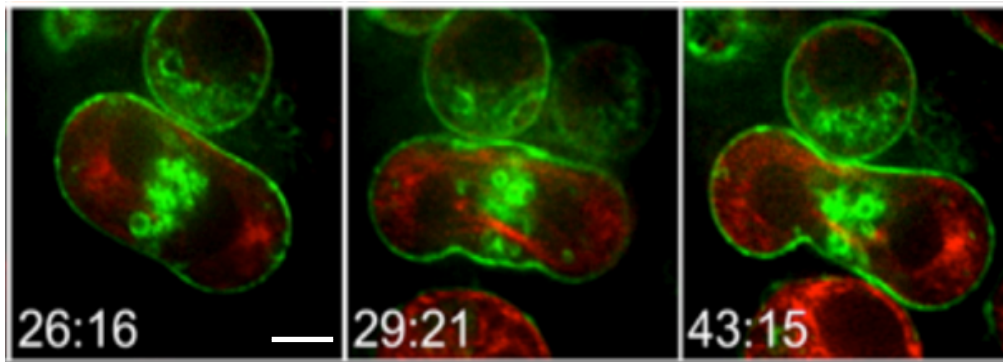


Figure 4.1 : enrichissement des vacuoles sur l'axe du sillon de clivage. Des cellules déplétées pour dOCRL expriment Utrophine-GFP (une sonde de l'actine) et l'alpha-tubuline-mCherry. Barre = 5 $\mu$ m. [Adaptée de (195)].

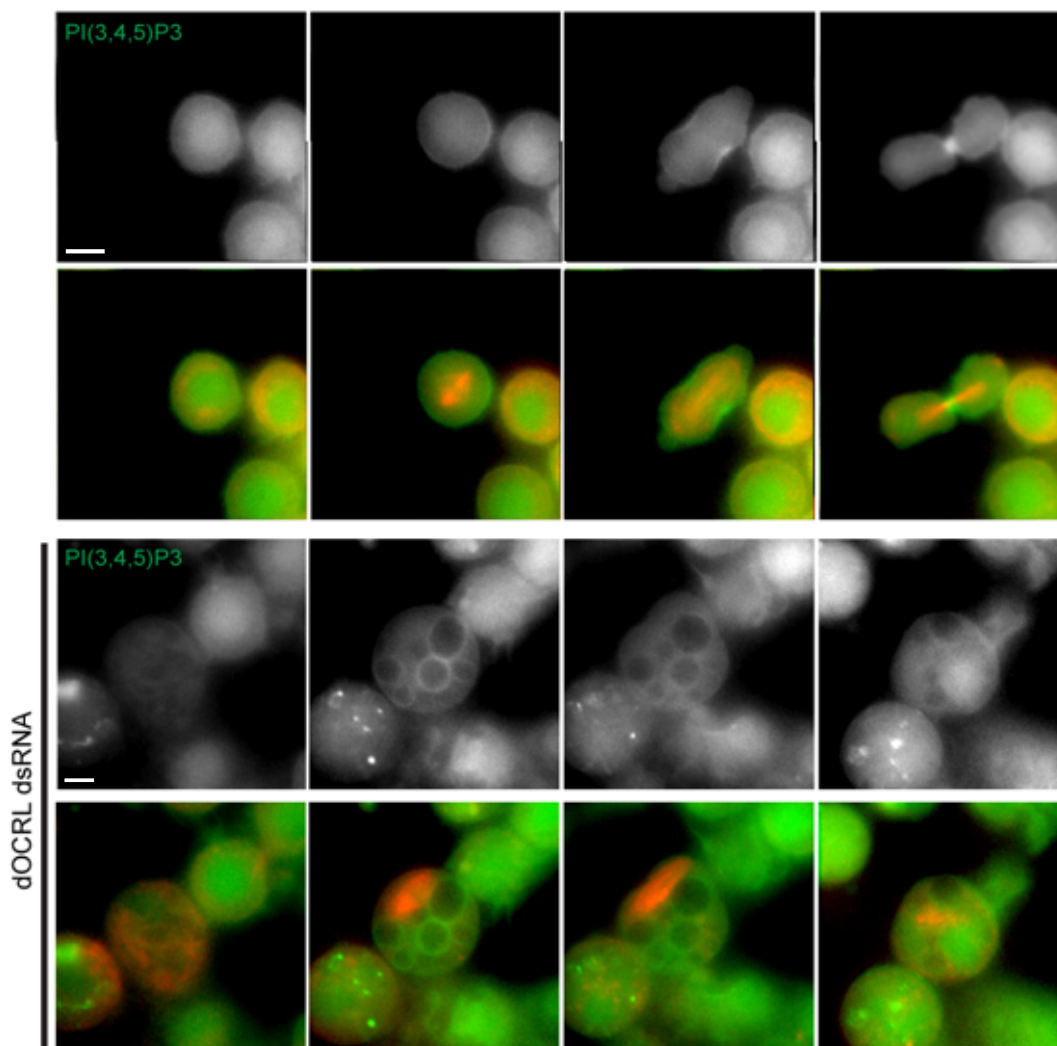


Figure 4.2 : Localisation du PI(3,4,5)P3 durant la division cellulaire : Des cellules exprimant une sonde de PI(3,4,5)P3 (le domaine PH de BTK) fusionnées à la GFP (vert) et l'alpha-tubuline-mCh (rouge) sont traitées (ou pas) au dsRNA dOCRL. La cellule contrôle montre un enrichissement du PI(3,4,5)P3 au niveau du sillon de clivage. La cellule déplétée pour dOCRL montre un enrichissement endomembranaire de PI(3,4,5)P3. Barre = 5 $\mu$ m

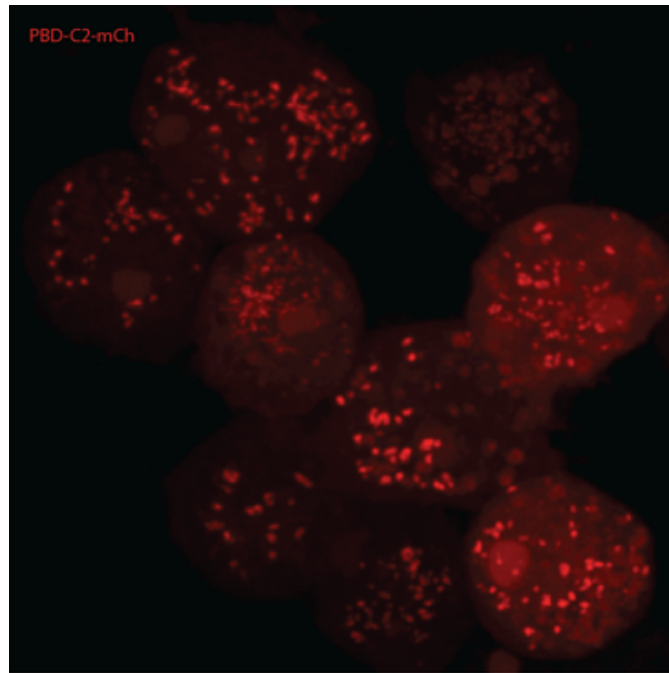


Figure 4.3 Localisation vacuolaire de PBD-C2-mCh. Des cellules S2 contrôles expriment transitoirement PBD-C2-mCh (avec VM et Jalila Chagraoui). Barre = 5 $\mu$ m.

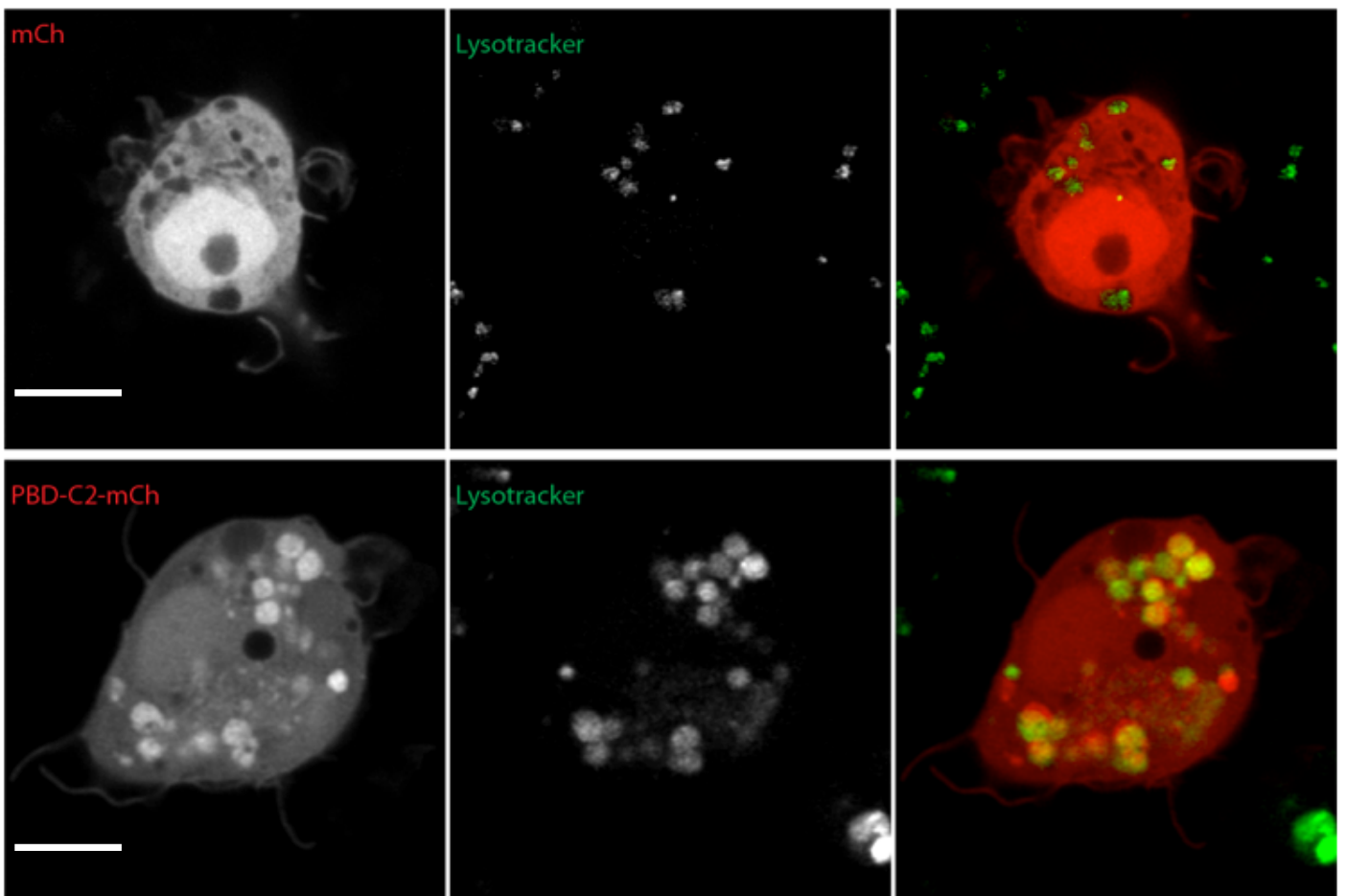


Figure 4.4 : PBD-C2 se localise au niveau des lysosomes. Dans des cellules S2 contrôles qui expriment transitoirement PBD-C2-mCh, les lysosomes sont marqués avec le lysotracker (vert) (avec VM). Barre = 5 $\mu$ m.

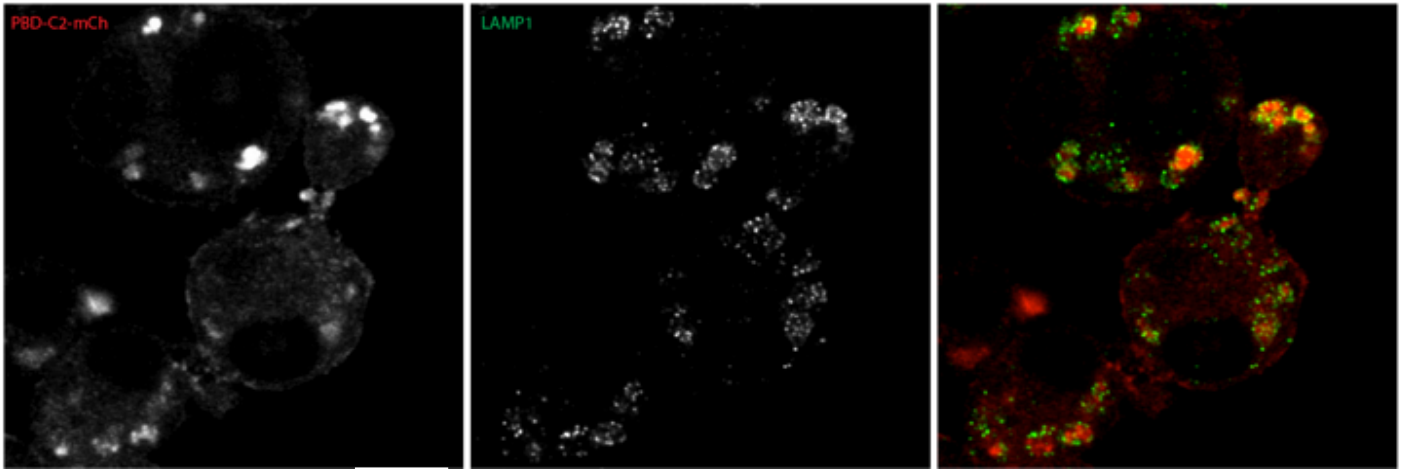


Figure 4.5 : PBD-C2-mCh se localise sur les lysosomes. Les lysosomes sont marqués par un anticorps anti- LAMP1 dans des cellules S2 contrôles qui expriment transitoirement PBD-C2-mCh, (avec l'aide de VM). Barre = 5µm.

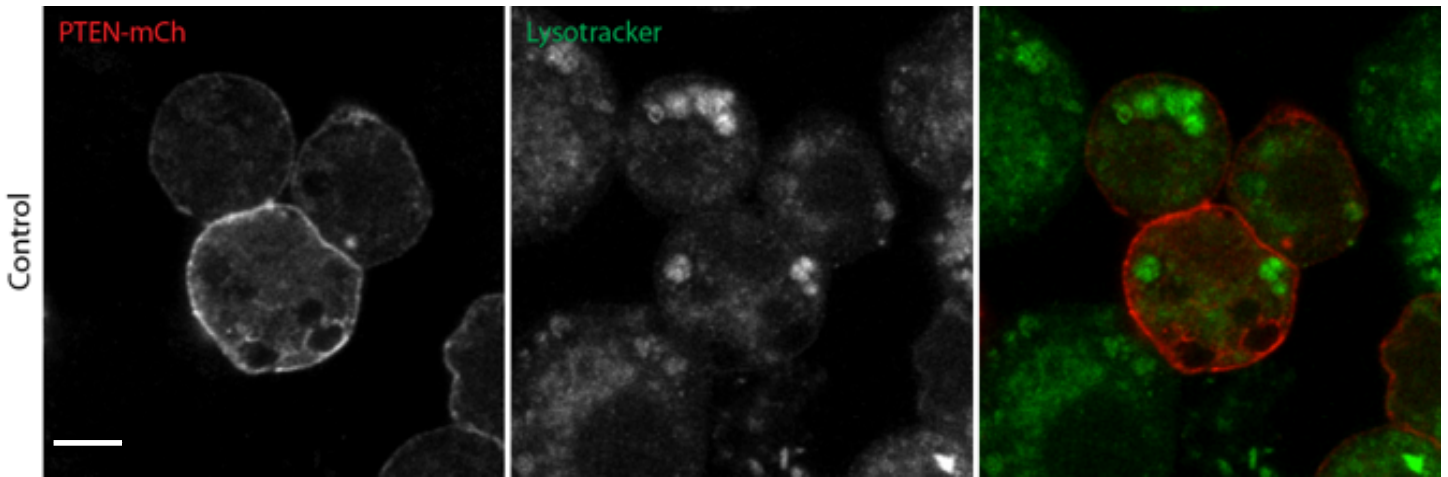


Figure 4.6 : La forme entière de PTEN se localise à la membrane plasmique. Les lysosomes sont marqués par le lysotracker dans des cellules S2 contrôles qui expriment transitoirement PTEN-mCh. Barre = 5µm.

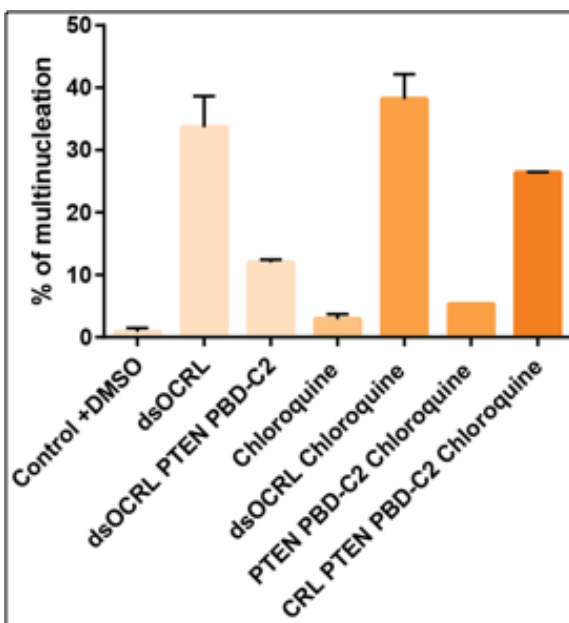


Figure 4.7 : Le sauvetage de la déplétion de dOCRL dépend de l'autophagie (résultats préliminaires avec Jalila Chagraoui).

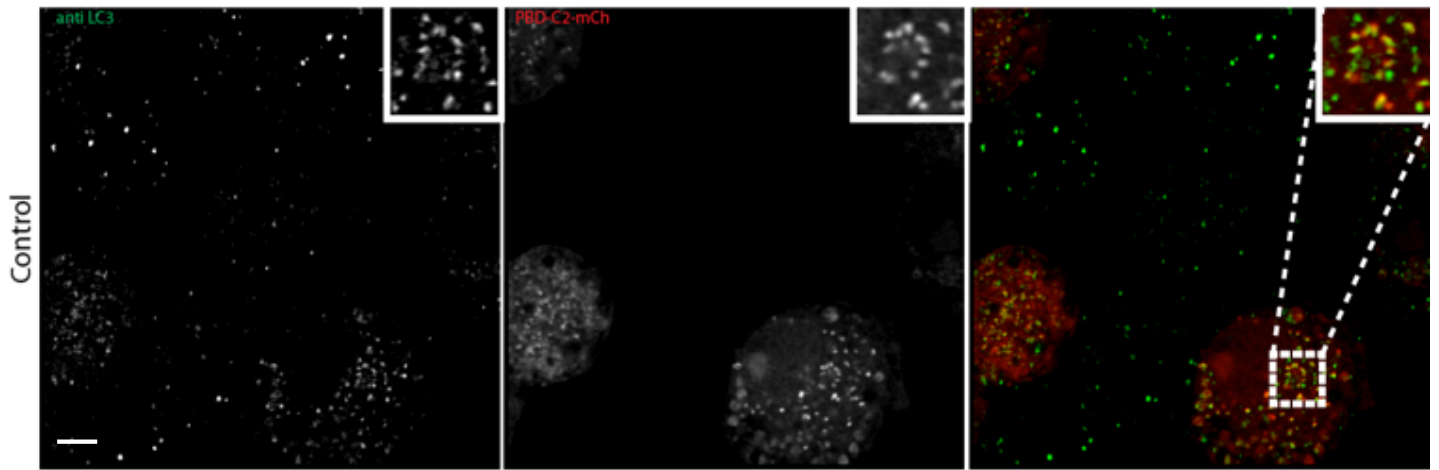


Figure 4.8 : PBD-C2 se localise sur les autophagosomes et/ou les autolysosomes (avec l'aide de VM).  
Barre = 5µm.

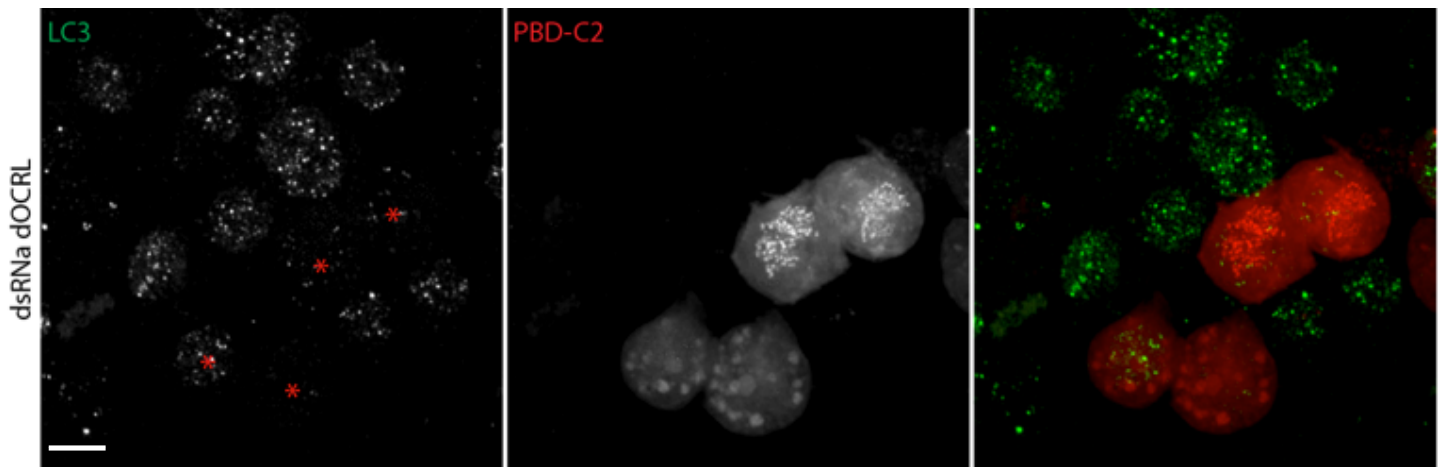


Figure 4.9 : PBD-C2 réduit le nombre d'autophagosomes dans les cellules déplétées pour dOCRL. Les  
astérisques rouges indiquent les cellules qui expriment PBD-C2-mCh (avec l'aide de VM). Barre = 5µm.

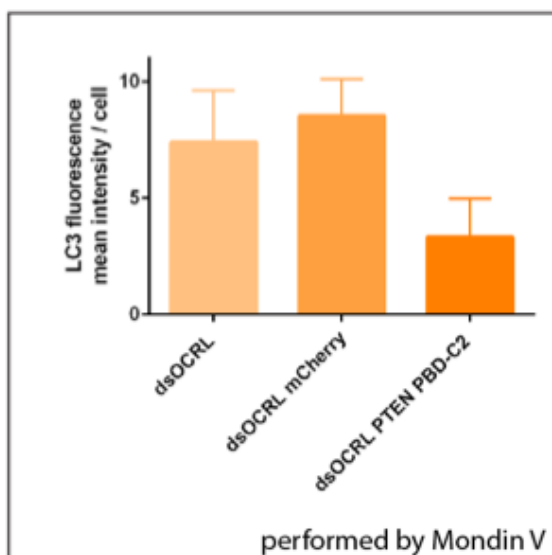


Figure 4.10 : La surexpression de PBD-C2 réduit l'intensité de fluorescence moyenne de LC3 dans des  
cellules déplétées pour dOCRL.



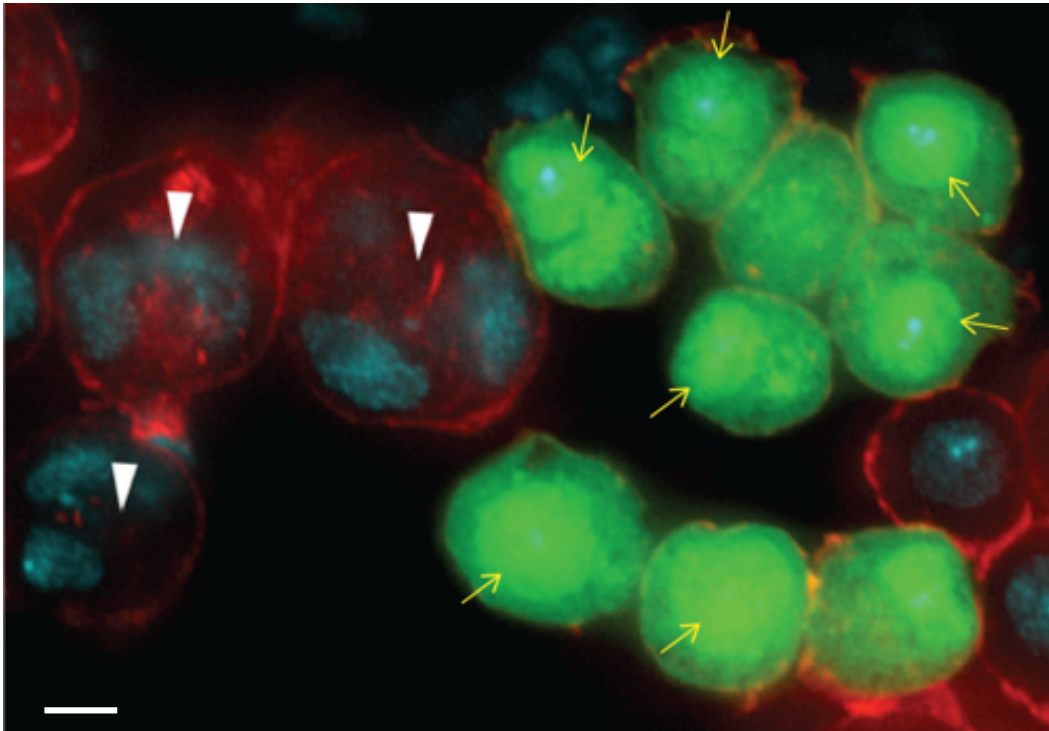


Figure 4.11 : Localisation partiellement nucléaire de PBD-C2-GFP.mDes cellules S2, déplétées pour dOCRL, expriment PBD-C2-GFP (en vert) et sont marquées pour l'actine (rouge) et l'ADN (cyan). Les flèches blanches indiquent les cellules binucléées. Les flèches jaunes indiquent une localisation de PBD-C2-GFP nucléaire. Barre = 5µm.

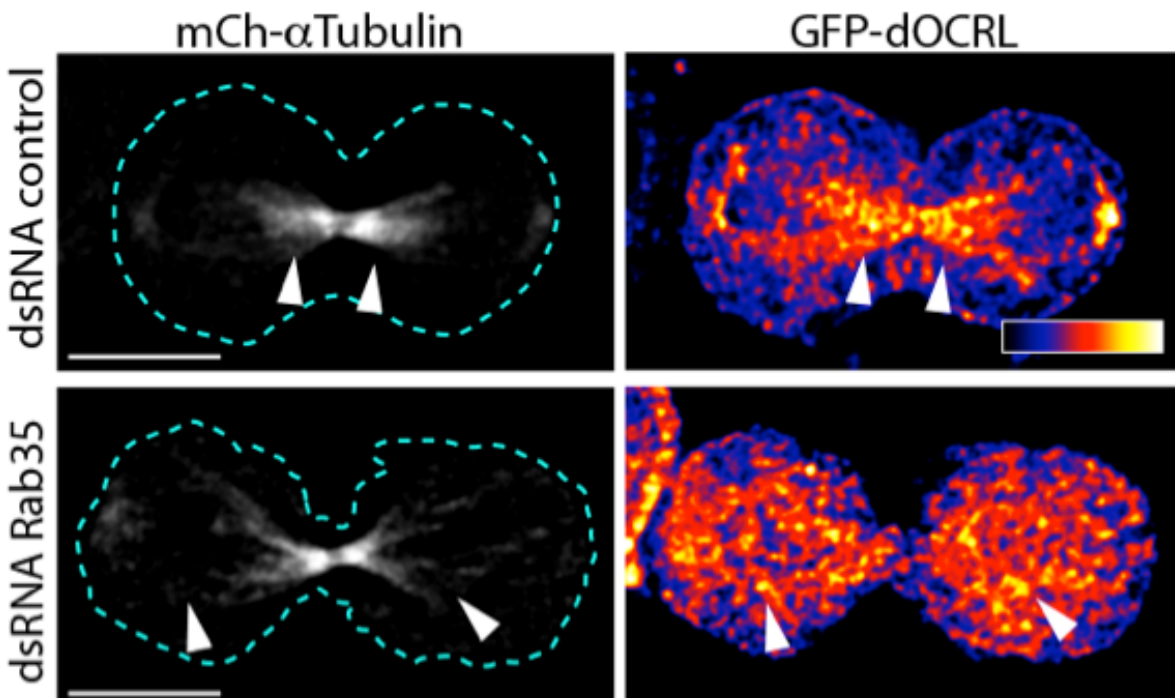


Figure 4.12 : La localisation de dOCRL au pont intercellulaire dépend de Rab35. Des cellules S2 qui expriment stablement mCh-αTubulin et GFP-dOCRL sont traitées avec un dsRNA contrôle ou Rab35. Les flèches blanches indiquent la localisation de dOCRL (avec Carl Laflamme). Barre = 8µm.

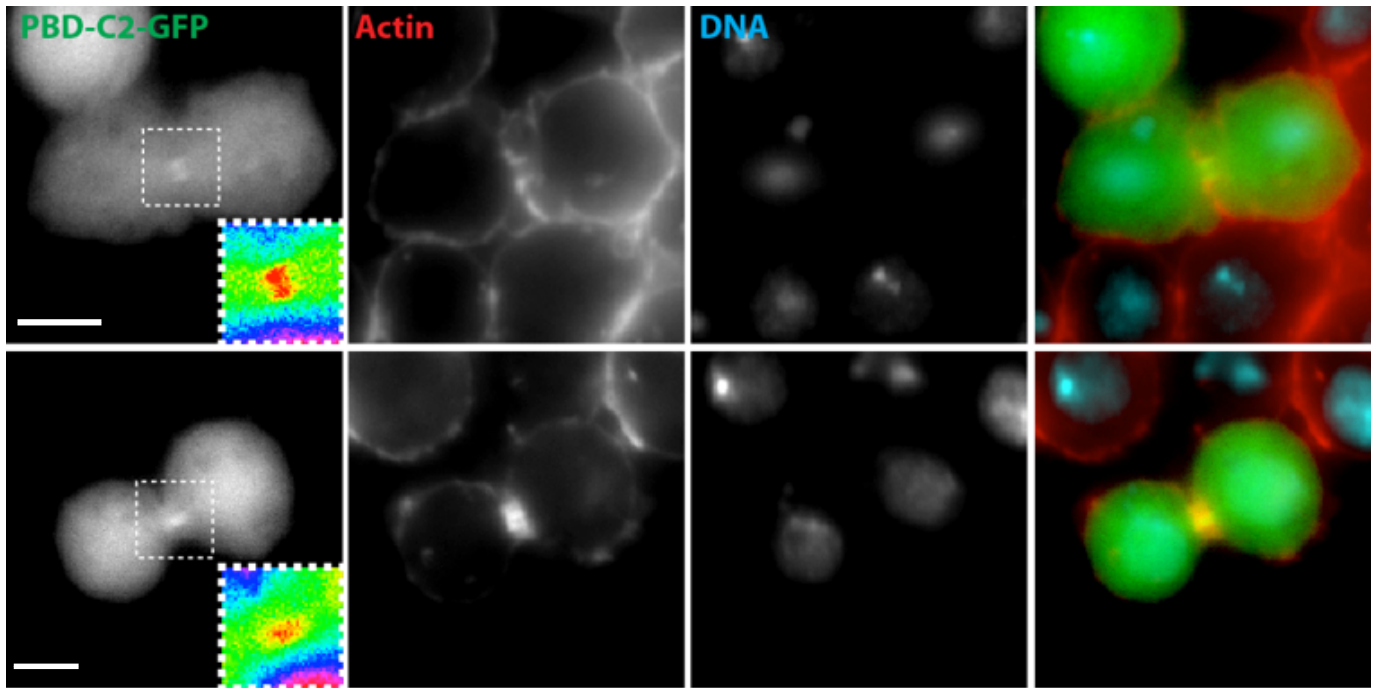


Figure 4.13 : PBD-C2-GFP se localise au niveau du midbody. L'actine et l'ADN sont marqués par la phalloïdine et le DAPI dans des cellules S2 contrôles qui expriment transitoirement PBD-C2-GFP. Barre = 5 $\mu$ m.

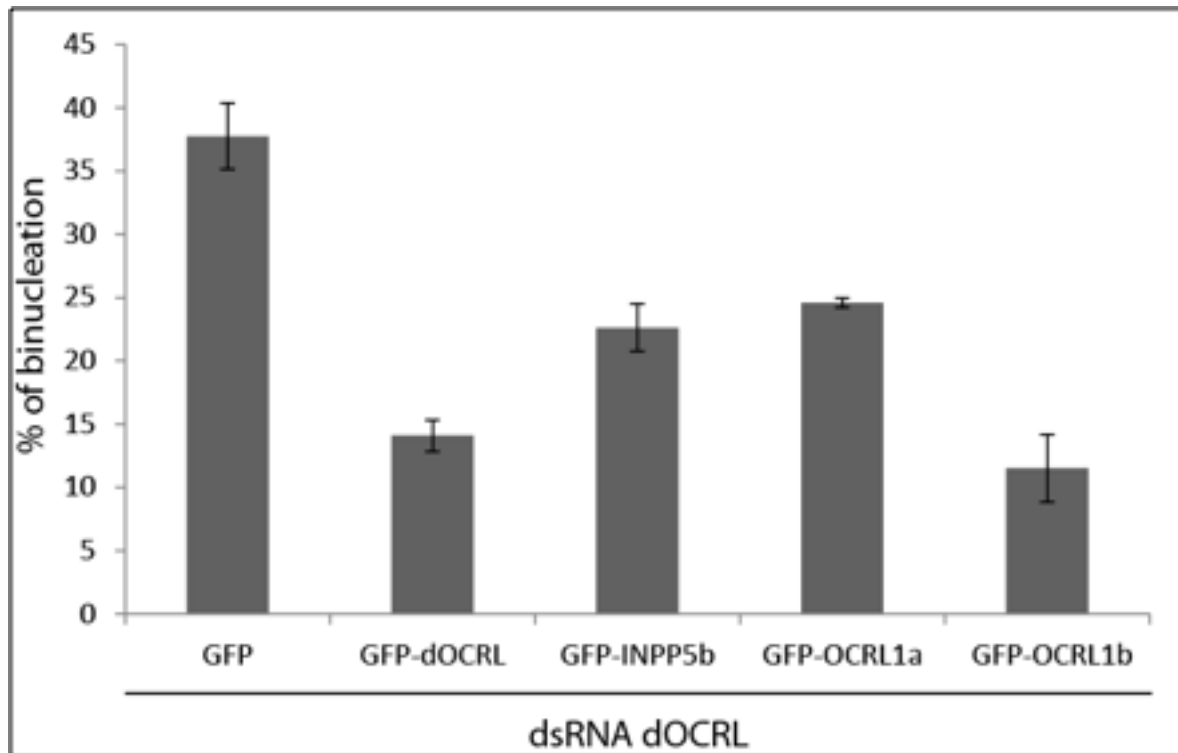


Figure 4.14 : OCRL1b humain sauve la déplétion de dOCRL dans les cellules S2. Des cellules S2 déplétées pour dOCRL expriment transitoirement les constructions indiquées.

## **Annexe 2**

### **Article**

# **Proteomics Screen Identifies Class I Rab11 Family Interacting Proteins as Key Regulators of Cytokinesis**

Article publié dans *Molecular and Cellular Biology* 2017 Jan 19;37(3)

# Proteomics Screen Identifies Class I Rab11 Family Interacting Proteins as Key Regulators of Cytokinesis

Carl Laflamme<sup>a\*</sup>, Jacob A. Galan<sup>a\*</sup>, Khaled Ben El Kadhi<sup>a</sup>, Antoine Méant<sup>a</sup>, Carlos Zeledon<sup>a</sup>, Sébastien Carréno<sup>a,b</sup>, Philippe P. Roux<sup>a,b</sup> and Gregory Emery<sup>a,b</sup>

- Author Affiliations

a-Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

b-Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

**Received** 11 May 2016 **Returned for modification** 18 June 2016 **Accepted** 11 November 2016

**Accepted manuscript posted online** 21 November 2016

Citation Laflamme C, Galan JA, Ben El Kadhi K, Méant A, Zeledon C, Carréno S, Roux PP, Emery G. 2017. Proteomics screen identifies class I Rab11 family interacting proteins as key regulators of cytokinesis. *Mol Cell Biol* 37:e00278-16. <https://doi.org/10.1128/ MCB.00278-16>. Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Philippe P. Roux, [philippe.roux@umontreal.ca](mailto:philippe.roux@umontreal.ca), or Gregory Emery, [gregory.emery@umontreal.ca](mailto:gregory.emery@umontreal.ca).

\* Present address: Carl Laflamme, Department of Neurology and Neurosurgery, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, Quebec, Canada; Jacob A. Galan, Department of Molecular Biology, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA.

**C.L., J.A.G., and K.B.E.K. contributed equally to this article.**

## ABSTRACT

The 14-3-3 protein family orchestrates a complex network of molecular interactions that regulates various biological processes. Owing to their role in regulating the cell cycle and protein trafficking, 14-3-3 proteins are prevalent in human diseases such as cancer, diabetes, and neurodegeneration. 14-3-3 proteins are expressed in all eukaryotic cells, suggesting that they mediate their biological functions through evolutionarily conserved protein interactions. To identify these core 14-3-3 client proteins, we used an affinity-based proteomics approach to

characterize and compare the human and *Drosophila* 14-3-3 interactomes. Using this approach, we identified a group of Rab11 effector proteins, termed class I Rab11 family interacting proteins (Rab11-FIPs), or Rip11 in *Drosophila*. We found that 14-3-3 binds to Rip11 in a phospho-dependent manner to ensure its proper subcellular distribution during cell division. Our results indicate that Rip11 plays an essential role in the regulation of cytokinesis and that this function requires its association with 14-3-3 but not with Rab11. Together, our results suggest an evolutionarily conserved role for 14-3-3 in controlling Rip11-dependent protein transport during cytokinesis.

#### **KEYWORDS**

14-3-3 cell division cytokinesis proteomics vesicular trafficking

#### **INTRODUCTION**

The evolutionarily conserved 14-3-3 family of pSer/Thr-binding proteins dynamically regulates the functions of various client proteins involved in diverse biological processes (1). Whereas vertebrates express seven distinct 14-3-3 proteins ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ , and  $\tau$ ), only two isoforms exist in *Drosophila melanogaster* ( $\epsilon$  and  $\zeta$ ), belonging to the two main 14-3-3 conservation groups (2). Structurally, 14-3-3 orthologues are very similar, as they adopt a dimeric U-shaped configuration with amphipathic grooves capable of accommodating two phosphorylated peptides (3). This feature allows 14-3-3 proteins to simultaneously bind two phosphorylated residues on one or two target proteins, thereby acting as scaffolding molecules. 14-3-3 proteins recognize the consensus sequence motifs RXX(pS/T)XP and RXXX(pS/T)XP (where X is any amino acid) in client proteins (4). However, phosphorylation-dependent sites that diverge significantly from these motifs have been described, with some 14-3-3 interaction being independent of phosphorylation (5). Molecularly, 14-3-3 binding may allosterically stabilize conformational changes, leading to activation or deactivation of the target or to interaction between two proteins (6). Furthermore, 14-3-3 binding may mask or expose interaction sites, often leading to changes in the subcellular localization of client proteins (7). While there are bound to be kingdom-specific 14-3-3 functions, the high level of structural conservation between 14-3-3 orthologues suggests that they regulate core cellular processes through evolutionarily conserved protein-protein interactions.

Rab GTPases constitute a large family of proteins that regulate all stages of intracellular membrane trafficking (8). When they are active, Rab proteins interact with downstream effectors, which then perform diverse cellular functions necessary for vesicle formation, motility, docking,

and fusion. Members of the Rab11 subfamily (Rab11a, Rab11b, and Rab25) localize to the endosomal recycling compartment and have been implicated in a variety of biological process, including cell division (9). Rab11 function is mediated by several effector proteins, including the Rab11 family interacting proteins (Rab11-FIPs; also known as FIPs). The FIPs constitute an evolutionarily conserved family of Rab11 effectors known to bridge from Rab GTPases to different molecular motors, ensuring vesicle motility (10). The FIPs are divided into two different classes, based on whether they possess phospholipid-binding C2 domains (class I) or EF-hand domains (class II) (10). Mammalian class I FIPs (FIP1, FIP2, and FIP5) are involved in polarized transport of cargos during epithelial cell polarity and are known to be regulated through phosphorylation (11–14). Rip11 is the only class I FIP in *Drosophila* and was shown to be involved in rhodopsin transport to the apical surface of photoreceptor cells (15) and in E-cadherin trafficking during trachea formation (16). Mammalian class II FIPs (FIP3 and FIP4) and their *Drosophila* orthologue Nuf are well-established regulators of cytokinesis (17–20). While the repertoire of FIP functions is expanding, much work is still required to understand the mechanisms regulating their activity.

Cytokinesis is the final step of cell division and leads to the physical separation of the daughter cells. After ingression of the cleavage furrow, future daughter cells remain connected by an intercellular bridge that is cleaved by a process called abscission. This process was shown to involve membrane trafficking, membrane fission (21), and lipid and cytoskeleton remodeling (22, 23).

Here we present the results of a proteomics screen aimed at characterizing the interactomes of 14-3-3 orthologues in multiple species. In total, we identified 141 proteins that interact with 14-3-3 in both human and *Drosophila* cells, suggesting that they regulate core and evolutionarily conserved biological processes. Among these, we identified all human class I FIPs (FIP1, -2, and 5) and their *Drosophila* orthologue Rip11 and found that 14-3-3 directly binds phosphorylated T391 and S405 in Rip11. We show that this interaction is required for successful cytokinesis in *Drosophila* cells, while binding to Rab11 is dispensable. 14-3-3 was previously shown to be involved in the regulation of protein synthesis during mitosis (24) and in preventing the centralspindlin complex, an essential protein complex involved in central spindle assembly (25–27), from oligomerizing *in vitro* (28). Our results describe a new 14-3-3 function during

cytokinesis and suggest that it is part of an evolutionarily conserved pathway that controls important vesicular trafficking events during late cytokinesis.

## RESULTS

Proteomics-based strategy to identify evolutionarily conserved 14-3-3 client proteins. To characterize the 14-3-3 interactome in cells from different organisms, we devised an affinity-based approach using the  $\epsilon$  and  $\zeta$  isoforms of 14-3-3, which are the only two isoforms present in both humans and *Drosophila*. To specifically identify phosphorylation-dependent binders, we mutated a conserved residue (Lys49 in human 14-3-3 $\epsilon$ ) present in all 14-3-3 orthologues which is involved in creating a salt bridge with the phosphorylated residue of client proteins (29). These 14-3-3 mutants (K49E) were used in subtractive fractionation steps in which nonspecific (glutathione S-transferase [GST] alone) and non-phospho-dependent (GST-14-3-3K49E) interactions were removed (Fig. 1A). As a source of client proteins, we used lysates of *Drosophila* S2 and HEK293 cells growing in serum, which were subjected to 14-3-3 affinity purification with both wild-type (wt) and K49E mutant 14-3-3 proteins. Following stringent washes in high-salt buffers, associated proteins were eluted, precipitated, and resolved by SDS-PAGE (Fig. 1A and B). To determine whether our method could specifically enrich 14-3-3 client proteins, we used a phospho-motif antibody that detects the phosphorylated 14-3-3 binding sequence RXX(pS/T)XP. As expected, we found that proteins eluted from wt 14-3-3 were highly immunoreactive to the phospho-motif antibody, whereas no signal could be detected in proteins eluted from the K49E mutant (Fig. 1B).

Having validated our approach, we performed large-scale experiments using both human and *Drosophila* 14-3-3 $\epsilon$  and - $\zeta$ . Eluates for both wt and mutant 14-3-3 proteins were resolved by SDS-PAGE, proteins were in-gel digested with trypsin, and peptides were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Although some of the proteins found to interact with the 14-3-3 K49E mutant may be phospho-independent binders, they were removed from our analyses to focus on phosphorylation-dependent interactions. While we initially intended to identify isoform-specific binders of 14-3-3, we found that both the  $\zeta$  and  $\epsilon$  isoforms were capable of forming homo- and heterodimers with endogenous 14-3-3 isoforms, which prevented us from determining isoform-specific interactions. Nevertheless, our approach led to the identification of 1,842 and 308 proteins that bound to human and *Drosophila* 14-3-3 proteins, respectively (Fig.

1C; see Tables S1 and S2 in the supplemental material). Notably, we found that nearly 50% of identified *Drosophila* proteins were also identified in the human counterparts as one or multiple orthologues, corresponding to 141 orthologous 14-3-3 binding partners (Table S3). To characterize the global signature of the evolutionarily conserved 14-3-3 interactome, we used the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) platform. We found enrichments of several cellular and molecular functions, including mRNA translation ( $P < 3.8E-10$ ), nucleotide metabolism ( $P < 8.4E-06$ ), and mitosis ( $P < 2.8E-05$ ) (Fig. 1D). Taken together, these data revealed many conserved 14-3-3 interactions and shed new light on unexplored 14-3-3 functions related to fundamental biological processes.

Class I FIPs are conserved 14-3-3 binding proteins. The most abundant 14-3-3 binding protein identified for *Drosophila* cells was Rip11, a member of the class I Rab11-FIPs (Fig. 1E). All three human orthologues of Rip11 (FIP1, FIP2, and FIP5) were also identified in our proteomics screen (Fig. 2A), suggesting that class I FIPs are important 14-3-3 binding proteins. Notably, none of the orthologous members of the class II FIPs were identified in our study (Fig. 2A). Accordingly, only class I FIPs were confirmed to be 14-3-3 binding proteins in human cells (Fig. 2B). To ascertain that this interaction was indeed phosphorylation dependent, we tested the association of human FIP5 (Fig. 2C), the class I FIP with the highest sequence coverage in the proteomics screen, and *Drosophila* Rip11 (Fig. 2D) with wt and K49E mutant 14-3-3 $\epsilon$  proteins. We found that the binding of these two orthologous class I FIPs was almost completely abrogated by the K49E mutation, suggesting that the interaction requires prior phosphorylation (Fig. 2C and D). These results were extended by showing that recombinant 14-3-3 $\epsilon$  interacts directly with human FIP5 or *Drosophila* Rip11 by far-Western analysis (Fig. 2E and F). Notably, we found that  $\lambda$ -phosphatase treatment of human FIP5 and *Drosophila* Rip11 abrogated 14-3-3 $\epsilon$  binding, confirming the need for class I FIP phosphorylation (Fig. 2E and F). We then assessed if the interaction between FIP5 and 14-3-3 could be detected in cells by performing immunoprecipitation of myc-tagged FIP5 and hemagglutinin (HA)-tagged 14-3-3 isoforms (Fig. 2G). We found that FIP5 was able to bind to 14-3-3 $\beta$  and 14-3-3 $\sigma$ , but we could not detect an interaction with either 14-3-3 $\gamma$  or 14-3-3 $\zeta$ . Finally, we determined whether 14-3-3 $\epsilon$  binding to class I FIPs could be outcompeted by the R18 peptide (PHCVPRDLSWLDLEANMCLP), which binds to the same amphipathic groove on the surface of 14-3-3 as that for phosphorylated peptides (30, 31). Consistent with our previous observations, we found that increasing



concentrations of the R18 peptide inhibited human FIP5 and *Drosophila* Rip11 binding to 14-3-3 $\epsilon$  (Fig. 2H and I). Together, these data demonstrate that class I FIPs are specific binding partners of 14-3-3 and that these interactions require their phosphorylation in cells.

14-3-3 interacts with the RBD of Rip11 via Thr391 and Ser405. To determine the region within Rip11 involved in 14-3-3 binding, we generated various N-terminal and C-terminal deletion mutants of Rip11 fused to green fluorescent protein (GFP) (Fig. 3A). These mutants were expressed in *Drosophila* S2 cells to evaluate their interaction with 14-3-3 $\epsilon$  in pulldown assays. Notably, we found that only Rip11 fragments containing the Rab11 binding domain (RBD; amino acids [aa] 352 to 409) associated with 14-3-3 $\epsilon$  (Fig. 3B), indicating that this domain contains phosphorylated residues involved in 14-3-3 binding. Sequence analysis of the RBD by use of the prediction software 14-3-3-Pred (32) revealed two potential 14-3-3 binding sites, containing Thr391 [RVME(pT)HP] and Ser405 [RTT(pS)] (Fig. 3A). These residues were mutated to unphosphorylatable residues (T391A, S405A, and T391A/S405A [TS/AA] mutations), and the resulting mutants were tested for the ability to interact with 14-3-3 in a pulldown assay. While both single point mutants (T391A and S405A) retained the ability to interact with 14-3-3 $\epsilon$ , we found that mutation of both sites strongly reduced 14-3-3 $\epsilon$  binding (Fig. 3C), indicating that both T391 and S405 are required for this phospho-dependent interaction.

To address if T391 and S405 are involved in 14-3-3 binding in cells, we expressed myc-tagged 14-3-3 $\epsilon$  together with GFP-tagged Rip11 constructs in S2 cells and proceeded to perform coimmunoprecipitation assays. While Rip11<sup>WT</sup> was efficiently coimmunoprecipitated with 14-3-3 $\epsilon$ , we found that mutation of both T391 and S405 (TS/AA) completely abolished this interaction (Fig. 3D). To verify if the loss of 14-3-3 binding was due to improper folding of the mutant Rip11 proteins, we tested their ability to interact with active Rab11 in a pulldown assay (33). As shown in Fig. 3E, we found that the TS/AA mutant of Rip11 retained the ability to interact with Rab11, indicating that mutation of T391 and S405 did not disrupt the overall structure of the RBD.

This observation prompted us to determine whether Rab11 binding to Rip11 is necessary for the Rip11–14-3-3 interaction. For this purpose, we mutated the conserved Y380 residue of Rip11 (Fig. 3A) to a serine residue (Y380S), which is predicted to disrupt Rip11 binding to Rab11 (34, 35). Accordingly, we found that this mutant lost the ability to interact with active Rab11 in pulldown assays (Fig. 3E). Next, we tested the ability of the Y380S mutant to interact with 14-3-

3, and we found that Rab11 binding was not required for the interaction between Rip11 and 14-3-3 (Fig. 3D). Hence, these findings indicate that 14-3-3 interacts with Rip11 independently of Rab11.

T391 and S405 are required for Rip11 distribution during cytokinesis. To gain insights into the function of 14-3-3 binding to Rip11, we examined Rip11's endogenous localization in *Drosophila* S2 cells. While Rip11 appeared to be recruited to vesicles distributed throughout the cytoplasm of interphase cells, we found that its distribution changed dramatically during mitosis. During metaphase, Rip11 vesicles were located in the vicinity of the plasma membrane and were redistributed close to the site of furrow ingression and on the central spindle during early telophase (Fig. 4A). In mid- to late telophase, Rip11 vesicles were enriched on the central spindle, near the cleavage furrow and at the intercellular bridge (Fig. 4A), and appeared to be mostly Rab11 positive (Fig. 4B).

We next investigated whether 14-3-3 binding is involved in the localization of Rip11 during mitosis. For this purpose, we performed time-lapse microscopy using S2 cells stably expressing GFP-tagged Rip11 constructs. This system appeared to be suitable for localization studies, as the distribution of GFP::Rip11<sup>WT</sup> was found to be similar to that of endogenous Rip11 (Fig. 4A and C). Interestingly, we found that GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> was also recruited to vesicles enriched near the cleavage furrow during mid- and late telophase, but their distribution was more dispersed, with numerous GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> vesicles found close to the poles of dividing cells (Fig. 4C). To quantify the difference in localization at late telophase between the different Rip11 mutants, we determined the enrichment of the protein near the cleavage furrow by measuring the ratio of the mean GFP fluorescence of an area expanding 1  $\mu\text{m}$  around the cleavage plane to the mean GFP fluorescence of the entire cell (Fig. 4D; Movie S1). We found a 2.7-fold enrichment of GFP::Rip11<sup>WT</sup>, which dropped to 1.5-fold for GFP::Rip11<sup>TS/AA</sup> (Fig. 4D'; Movie S2). These results suggest that 14-3-3 binding promotes the accumulation of Rip11 at the cleavage furrow during late telophase.

Rip11 is involved in late stages of cytokinesis. The distribution of Rip11 during mitosis suggests a role during cytokinesis. To test this hypothesis, we depleted Rip11 by use of RNA interference (RNAi) and quantified the percentage of multinucleated cells as a marker of cytokinesis failure. Depletion of Rip11 by use of double-stranded RNA (dsRNA) sequences targeting either the coding sequence or the 5' untranslated region (UTR) induced a rate of multinucleated cells of

24.4% or 18.8%, respectively (Fig. 5A and B). For succeeding experiments, we used the dsRNA targeting the 5' UTR, as it allowed us to perform rescue experiments. Hence, we confirmed that this dsRNA efficiently depleted both Rip11 isoforms (Rip11-PA and Rip11-PB) by Western blotting of S2 cell protein lysates (Fig. 5C; Movies S3 and S4). Both isoforms comprise an N-terminal C2 domain and a C-terminal RBD, but Rip11-PA also contains a larger central region of unknown function.

To determine which cytokinesis step(s) is impaired by the depletion of Rip11, we performed time-lapse microscopy of S2 cells expressing both mCherry-tagged anillin and a GFP fusion to the regulatory light chain of myosin II (Sqh-GFP) as markers of the cytokinesis machinery (Fig. 5D) (36). We observed that cytokinesis failed in 20.4% of the cells depleted of Rip11 ( $n = 416$ ). In these cells, the cytokinesis furrow regressed  $61 \pm 23$  min after formation of the midbody, indicating that Rip11 is involved in late stages of cytokinesis. Interestingly, we also observed that anillin and Sqh were aberrantly recruited to internal vesicles in 31.7% of the dividing cells depleted of Rip11. A majority (54.5%) of these cells failed to complete cytokinesis. This suggests that Rip11 is required for the progression of cytokinesis by regulating the localization of anillin and Sqh at the cleavage furrow.

Rip11 function during cytokinesis depends on 14-3-3 binding. To examine whether Rip11 function during cytokinesis requires 14-3-3 binding, we performed rescue experiments with *Drosophila* S2 cells subjected to Rip11 RNAi. Cells were stably transfected with various dsRNA-insensitive GFP-tagged constructs of Rip11 (Fig. 6A), and the multinucleated phenotype was quantified. We found that expression of a GFP fusion to the shorter isoform of Rip11 (Rip11-PB; labeled GFP::Rip11WT here) rescued the phenotype, suggesting that it was fully functional during cytokinesis. Similarly, the single point mutant GFP::Rip11S405A efficiently rescued cytokinesis, while the single point mutant GFP::Rip11T391A only partially prevented this phenotype. Conversely, our results showed that expression of GFP::Rip11TS/AA completely failed to restore cytokinesis completion (Fig. 6A), suggesting that Rip11 function during cytokinesis requires its phosphorylation-dependent association with 14-3-3.

To determine whether constitutive 14-3-3 binding is sufficient to restore the function of Rip11 during cytokinesis, we fused GFP::Rip11TS/AA with the R18 sequence (GFP::Rip11TS/AA::R18), which promotes 14-3-3 $\epsilon$  association independently of phosphorylation (Fig. 6B). Interestingly, although the R18 fusion abrogated Rab11 binding (Fig.

6C), it was able to significantly rescue cytokinesis upon Rip11 knockdown (Fig. 6A). These results support the notion that binding to 14-3-3 is necessary for Rip11 function during cytokinesis.

To confirm that the binding to Rab11 is dispensable for Rip11 function during cytokinesis, we expressed the Rab11 binding-deficient Rip11 mutant (Rip11Y380S) and tested it for the ability to rescue cytokinesis in S2 cells depleted of Rip11. Importantly, we observed a complete cytokinesis rescue (Fig. 6A) with Rip11Y380S, confirming that Rip11 acts independently of Rab11 binding for its function in cytokinesis.

To determine if the binding to 14-3-3 is required for Rip11 function in the absence of Rab11 binding, we expressed a Rip11 mutant deficient in both Rab11 and 14-3-3 binding through compounded point mutations (GFP::Rip11YTS/SAA) (Fig. 6B and C). Similar to the results we obtained with GFP::Rip11TS/AA and GFP::Rip11 $\Delta$ RBD, we found that these mutants failed to rescue cytokinesis in S2 cells depleted of Rip11 (Fig. 6A). Hence, while all the previously described functions of Rip11 are dependent on Rab11 binding, its function during cytokinesis appears to be Rab11 independent and requires its interaction with 14-3-3.

Finally, as we previously found that the loss of binding to 14-3-3 changes the distribution of Rip11 vesicles (Fig. 4C and D), we imaged the different mutants of Rip11 in rescue experiments (Fig. 7). We found that GFP::Rip11WT, GFP::Rip11S405A, and GFP::Rip11T391A were present in vesicles close to the cytokinesis cleavage plane, while GFP::Rip11TS/AA vesicles were more dispersed. Both GFP::Rip11Y380S and GFP::Rip11YTS/SAA were found to be located mainly at the plasma membrane, including at the cleavage furrow, and occasionally on vesicles. Finally, GFP::Rip11TS/AA::R18 was found both at the plasma membrane and on vesicles accumulating near the cleavage furrow.

## **DISCUSSION**

Several proteomics studies have characterized the 14-3-3 interactome in human cells, but at the moment, little is known about the identities of 14-3-3 client proteins in other organisms and their levels of conservation across species. Here we simultaneously characterized the 14-3-3 interactomes in human and fly cells, with the rationale that conserved 14-3-3 interactions will reveal regulatory mechanisms that control fundamental biological processes. Our screening strategy also enriched phosphorylation-dependent 14-3-3 client proteins, suggesting the

involvement of a conserved set of kinases/phosphatases that regulates these interactions. Among identified proteins, we demonstrated that class I Rab11-FIPs are conserved 14-3-3 binding proteins and that this interaction is required for completion of cytokinesis. We found that 14-3-3 interacts with Rip11 via two phosphorylation sites located within its Rab11 binding domain but that Rab11 is dispensable for this newly characterized Rip11 function.

Rip11 was shown to interact with other Rab GTPases (37). Hence, it is possible that 14-3-3 regulates a function of Rip11 related to another Rab. A candidate screen performed in S2 cells revealed that Rab35 is an important regulator of cytokinesis (38), while in mammalian cells Rab35 was shown to ensure postfurling steps of cytokinesis by trafficking its effector OCRL to the intercellular bridge (38, 39). Previous work performed in HeLa cells linked 14-3-3 to the disassembly of the cytokinesis machinery (28, 40). In line with these findings, a role of Rip11/14-3-3 may be to regulate the trafficking of Rab35/Ocrl to allow the progression to abscission.

Some class I Rab11-FIPs were also shown to interact with myosin motors, such as kinesin-2 and myosin V, to promote protein trafficking (41, 42). Interestingly, kinesin-2 was shown to be involved in the delivery of Rab11-FIP5 to the cleavage furrow of epithelial cells (43), but whether Rip11 associates with kinesin-2 or another motor protein is currently unknown. Alternatively, 14-3-3 might regulate the C2 domain of Rip11 and its capacity to bind phospholipids, but more work will be required to assess these possibilities.

The function of 14-3-3 binding to Rip11 seems to be required at a precise time during cytokinesis, suggesting that its phosphorylation is tightly controlled. Identifying the kinase and/or phosphatase involved in Rip11 phosphorylation will be required to fully understand how its function is regulated. The basic residues located prior to T391 and S405 suggest the involvement of a basophilic kinase, such as protein kinase C (PKC). PKC was shown to have pleiotropic functions during mitosis (44), and although it is not impossible, determining its implication in the regulation of Rip11 function will likely be challenging.

In conclusion, our work led to the identification of a large number of 14-3-3 client proteins that are conserved across species. These results will be an important resource for future work on 14-3-3 proteins and the roles they play in fundamental processes, such as cell growth and division.

## **MATERIALS AND METHODS**

Plasmid constructs. Cloning of the different *Drosophila* constructs was done using Gateway technology (Invitrogen). We generated the different mutant forms of Rip11 by mutagenesis

(QuikChange; Agilent) directly on Rip11WT (all the Rip11 constructs used in this study were generated from the Rip11WT-PB isoform) in pDonor (33). We made the following Rip11 mutations: threonine 391 to alanine (T391A), serine 405 to alanine (S405A), and tyrosine 380 to serine (Y380S). The R18 peptide was fused directly after the last amino acid of Rip11TS/AA. All Rip11 constructs were recombined in a copper-inducible pMET vector with a GFP tag at the N terminus to allow expression in *Drosophila* S2 cells (pMet-picoblast-GFP vector; a gift from V. Archambault [Université de Montréal, Montréal, Canada]). 14-3-3 $\epsilon$  was subcloned into pDonor and further recombined in the pAMW vector (actin promoter; myc tag at the N terminus). GST::Rab11CA and Rab11 were generated by use of the pDonor vector as previously described (33). Rab11 was recombined in pDest28 (UAS promoter; mCherry tag at the N terminus). GFP::tubulin was a gift from G. Hickson (Hôpital Sainte-Justine, Montréal, Canada).

Human FIP1, FIP2, FIP3, and FIP4 cloned into the p-EGFP-C1 plasmid for an N-terminal GFP tag were kind gifts from J. Goldenring (Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN), and human FIP5 cloned into the p-EGFP-C1 plasmid was a gift from M. W. McCaffrey (University College Cork, Cork, Ireland). FIP5 was cloned into pcDNA3 to introduce an N-terminal myc tag.

**Drosophila S2 cell culture and dsRNA treatment.** *Drosophila* S2 cells were grown in Schneider's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) supplemented with antibiotics. Stable cell lines were generated by transfecting the indicated constructs by use of Transit-LT1 transfection agent (Mirus). Blasticidin was used as a selection agent. mCherry::anillin- and Sqh::GFP-expressing S2 cells were obtained from the G. Hickson laboratory (45). For fixed samples, cells were cultured in a 96-well glass-bottomed plate (Greiner) for 6 days and treated with 3.5  $\mu$ g of dsRNA at day 0 and day 3. For time-lapse microscopy, cells were cultured in a 96-well plate and treated with 3.5  $\mu$ g of dsRNA at day 0 and 1  $\mu$ g of dsRNA at day 3, and they were imaged at day 5.

dsRNAs were produced and used as previously described (46), using the following primers: for Gal4 control dsRNA, Gal4 forward (AGAAGTAAGGCGGTCGGGATAGT) and reverse (AGACACCAGCGAAATGGATTTTT) primers; and for Rip11, CDS forward (CCGGCAAGGAGAAGAAGAAC) and reverse (GTTGCCGATGGACAACAGAC) primers and 5' UTR forward (CTACACTACGTTCTCCTGGCG) and reverse (CCTTTCGTTTCTTCTTCTTTGC) primers.

Imaging of fixed samples, time-lapse recording, and quantifications. For immunofluorescence assays and staining, we used mouse (1/200; Sigma) or rat (1/50; AbD Serotec) anti- $\alpha$ -tubulin, rabbit anti-Rip11 (1/2,000; a gift from J. Casanova, Institut de Biologia Molecular de Barcelona-CSIC, Barcelona, Spain), and Alexa Fluor 488-phalloidin (1/100; Cell Signaling) for F-actin staining. DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma) was used to stain nuclei. Images were acquired using either a 63 $\times$  (numerical aperture [NA] = 1.4) or 100 $\times$  (NA = 1.42) planApo objective on a Deltavision microscope (Applied Precision) equipped with a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics). Deconvolution was carried out using SoftWoRx software, version 5.5. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and then proceeded for immunostaining (46), while time-lapse imaging was performed in an environmental chamber at 25°C. All cell images represent a single focal plane. They were prepared for publication using Adobe Photoshop to adjust contrast, Gaussian blur, and levels and then assembled with Adobe Illustrator.

Quantifications of GFP::Rip11 were performed as follows. Using Adobe Photoshop, a rectangular selection box with a 2- $\mu$ m width was created and aligned with the middle of the cleavage furrow of late-telophase cells. The extremities of the box were modified to overlap the boundaries of the cleavage furrow. The mean fluorescence of GFP::Rip11 was measured in this region of interest [F(ROI)] and in the whole dividing cells [F(cell)]. The fluorescence intensities of both F(ROI) and F(cell) were corrected by background subtraction [and then called F(ROI)<sub>out</sub> and F(cell)<sub>out</sub>], and the ratio of F(ROI)<sub>out</sub> to F(cell)<sub>out</sub> was calculated to determine the enrichment of GFP::Rip11 at the cleavage furrow.

Rescue experiments. Stable S2 cell lines expressing the different GFP::Rip11 constructs under the control of the pMET promoter were treated with Rip11 5' UTR dsRNA at day 0 and day 3 and incubated with 0.5 mM CuSO<sub>4</sub> at day 4 of treatment. At day 6, cells were fixed and  $\alpha$ -tubulin was stained. The number of normal bi- or multinucleated cells was quantified and represented in a histogram.

Mammalian cell culture, treatments, and immunoprecipitation. HEK293 cells were maintained at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 4.5 g/liter glucose supplemented with 10% FBS and antibiotics. HEK293 cells were transfected using calcium phosphate precipitation as described previously (47). Cells were grown for 24 h after transfection and serum starved where indicated by using serum-free DMEM for an additional 16 to 18 h. Cell lysates were prepared as previously described (47). Briefly, cells were washed three times with ice-cold

phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in BLB (10 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 nM β-glycerophosphate, 0.5% Nonidet P-40, 0.1% Brij 35, 0.1% deoxycholic acid, 1 mM sodium orthovanadate [Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], and a Complete protease inhibitor cocktail tablet [Roche]). For immunoprecipitations, cell lysates were incubated with the indicated antibodies for 2 h, followed by a 1-h incubation with protein A–Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare). Immunoprecipitates were washed three times in lysis buffer, and beads were eluted and boiled in 2× reducing sample buffer (5× reducing sample buffer contains 60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, and 0.1% bromophenol blue).

14-3-3 immunoprecipitation and GST-Rab11 pulldown assays with S2 cells. S2 cells were cotransfected by use of Transit-LT1 transfection agent (Mirus) with both GFP::Rip11 and myc::14-3-3ε or GFP::Rip11 and GST::Rab11 constructs. GFP::Rip11 expression was induced by adding 0.5 mM CuSO<sub>4</sub> for 16 h, and cells were lysed in Nonidet P-40 lysis buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 137 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10% glycerol, and 1 mM EDTA) with protease and phosphatase inhibitors (48). For GST::Rab11CA pulldown assay, 50 μl of a 50% slurry of glutathione-Sepharose beads equilibrated in lysis buffer was added to protein lysates and rocked for 2 h at 4°C. For myc::14-3-3 immunoprecipitation, 1 μl of myc antibody (9E10) was added to the protein lysate and rocked for 2 h at 4°C. After incubation of cell lysates with antibodies, 50 μl of A/G beads (Santa Cruz Biotechnology) was added to the protein lysate for 1 h, and the mix was rocked at 4°C. Beads were washed four times with lysis buffer. Total protein lysates and eluted proteins were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes, and immunoblots were performed using the following antibodies: anti-GFP (1/1,000; Invitrogen), anti-GST (1/1,000; Cell Signaling), and anti-myc (9E10) (1/50,000). Stable S2 cell lines expressing different Rip11 variants were plated on day 1. GFP constructs were induced by adding 0.5 mM CuSO<sub>4</sub> for 8 h. Cells were lysed as described above and incubated with GST::14-3-3 beads. Beads were processed as described above.

Purification of GST::14-3-3 fusion proteins, subtractive fractionation, and pulldown assays. Fifty-milliliter overnight cultures of *Escherichia coli* BL21 transformed with pGEX-4T-14-3-3ε wild type or K49E mutant (kindly provided by Bryan Ballif) (49) were diluted to 500 ml and induced with 1 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) overnight at 25°C. Cells were pelleted and resuspended in 40 ml of bacterial lysis buffer (1× PBS, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X, 1 mM



PMSF, 1× protease inhibitor cocktail). Extracts were placed in 50-ml conical tubes on ice and sonicated using a probe sonicator six times for 30 s each, with 30-s delays between blasts. After sonication, the extracts were centrifuged at  $13,000 \times g$  for 30 min and aliquoted into 1-ml tubes to be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until further use. For subtractive fractionation, we used a previously described method (49). Briefly, serum-starved cells were lysed as described above. Cellular debris was removed by centrifugation for 10 min at  $13,000 \times g$ . The supernatant, corresponding to 20 mg of protein, was precleared by pouring it sequentially over glutathione-Sepharose (GE/Amersham/Pharmacia, Piscataway, NJ), glutathione-Sepharose bound to 500  $\mu\text{g}$  of GST, and glutathione-Sepharose bound to 250  $\mu\text{g}$  of GST::14-3-3 $\epsilon$  K49E. The flowthrough was divided equally and poured over GST::14-3-3 $\epsilon$  K49E (250  $\mu\text{g}$ ) or GST::14-3-3 $\epsilon$  wild type (250  $\mu\text{g}$ ) (as shown in the schematic in Fig. 1A). The beads were then washed 2 times with 2 ml of lysis buffer, followed by a final wash of 2 ml of lysis buffer lacking Nonidet P-40 and Brij 35. Cellular proteins bound to each column were eluted stepwise with 400  $\mu\text{l}$  of 400 mM  $\text{MgCl}_2$  in 50 mM HEPES and 400  $\mu\text{l}$  of 800 mM  $\text{MgCl}_2$  in 50 mM HEPES and finally chased with 200  $\mu\text{l}$  of 50 mM HEPES. Eluates were combined and precipitated with 15% trichloroacetic acid. Precipitated proteins were pelleted, washed with acetone, resuspended in reducing sample buffer, pH adjusted with a 1/6 volume of 1 M Tris base, boiled, and subjected to SDS-PAGE for Coomassie staining or immunoblotting. For smaller-scale GST pulldowns, cell lysates were incubated with 10  $\mu\text{g}$  of GST::14-3-3 $\epsilon$  wild type or K49E mutant for 2 h and washed four times with lysis buffer prior to elution with reducing sample buffer, SDS-PAGE, and immunoblotting. Sample preparation for mass spectrometry. Coomassie-stained SDS-PAGE gels were cut at regions corresponding to specific molecular weights. Gel slices were treated with 10 mM dithiothreitol (DTT) and incubated for 1 h at  $56^{\circ}\text{C}$ , followed by alkylation with 15 mM iodoacetamide for 1 h at  $25^{\circ}\text{C}$  in the dark. Proteins were digested overnight with sequencing-grade modified trypsin (enzyme/protein ratio of 1:50) at  $37^{\circ}\text{C}$ . Digested peptides from gels were extracted, and the volume was reduced by use of a speed vacuum. All peptide samples were resuspended in 0.2% formic acid.

Fractionation was analyzed by online reverse-phase chromatography coupled with an electrospray ionization interface to acquire MS (measuring the intensity and  $m/z$  ratio for peptides) and MS/MS (giving fragmentation spectra of peptides) scans. A nanoflow high-pressure liquid chromatography (HPLC) system (Eksigent; Thermo Fisher Scientific) was used

for online reverse-phase chromatographic separation; peptides were loaded into a 5-mm-long trap column (inner diameter, 300  $\mu\text{m}$ ) in buffer A (0.2% formic acid [FA]) and separated in an 18-cm-long fused silica capillary analytical column (inner diameter, 150  $\mu\text{m}$ ), both packed with 3  $\mu\text{m}$  200A Magic AQ C18 reverse-phase material (Michrom). Peptides were eluted by increasing the concentration of buffer B (0.2% FA in acetonitrile [ACN]) from 5 to 40% in 100 min. Following the gradient elution, the column was washed with 80% buffer B and reequilibrated with 5% buffer B. Peptides were eluted into the mass spectrometer at a flow rate of 600 nl/min. The total run time was approximately 125 min, including sample loading and column conditioning. Peptides were analyzed using automated data-dependent acquisition on a LTQ-Orbitrap Elite mass spectrometer. Each MS scan was acquired at a resolution of 240,000 full width at half maximum (fwhm) (at 400 m/z) for the mass range of 300 to 2,000 Th, with the lock mass option enabled (m/z 445.120025), and was followed by up to 12 MS/MS data-dependent scans on the most intense ions by use of collision-induced activation (CID). AGC target values for MS and MS/MS scans were set to  $1e6$  (maximum fill time of 500 ms) and  $1e5$  (maximum fill time of 50 ms), respectively. The precursor isolation window was set to 2 Th, with a CID normalized collision energy of 35; the dynamic exclusion window was set to 60 s.

Mass spectrometry data acquisition, quantitation analysis, and bioinformatics. MS data were analyzed using MASCOT software and searched against the Uniprot/SwissProt subset for *Drosophila* (Drome) and human release 2014 (<http://www.uniprot.org/>). Search criteria included a static modification of cysteine residues of +57.0214 Da, with a variable modification of +15.9949 Da to include potential oxidation of methionines. Searches were performed with semitryptic digestion and allowed a maximum of two missed cleavages on the peptides analyzed from the sequence database. The false discovery rate (FDR) for peptide, protein, and site identification was set to 1%. Bioinformatics analysis was done with DAVID software.

Statistical analysis. Statistical significances were determined by two-tailed Student's *t* tests. Results are expressed as means  $\pm$  standard errors of the means (SEM) or means  $\pm$  standard deviations (SD), as indicated in the figure legends. Statistical significance was assumed for *P* values of  $<0.05$ .

## **ACKNOWLEDGMENTS**

J.A.G. developed, performed, and analyzed the proteomics experiments related to the fly and human 14-3-3 interactomes, as well as all 14-3-3 pulldown assays and the far-Western analysis.

C.L. performed the molecular biology assays and *Drosophila* S2 cell culture, as well as the immunoprecipitation assays and Rab11 pulldown assays, together with C.Z. C.L. performed live-cell microscopy of Rip11 vesicles. K.B.E.K. performed live-cell imaging of Ani/Sqh cells, quantified multinucleated cells, and characterized the localization of the Rip11 mutants in rescue experiments. A.M. performed the FIP5 coimmunoprecipitations with HA-tagged 14-3-3. C.L., J.A.G., S.C., P.P.R., and G.E. wrote the manuscript.

We thank Jordi Casanova for the Rip11 antibody. We thank Gilles Hickson for helpful discussion and for reagents. We thank Vincent Archambault for Gateway plasmid reagents. We thank James Goldenring and Mary McCaffrey for providing mammalian FIP cDNAs.

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research (CIHR) grants MOP133683 (to S.C.), MOP123408 (to P.P.R.), and MOP114899 (to G.E.), a grant from the Human Frontier Science Program (to P.P.R.), a Cancer Research Society grant (to G.E.), and an NSERC grant (to G.E.). S.C. holds a New Investigator Award from the CIHR. P.P.R. holds a Canada Research Chair in Cell Signaling and Proteomics and a Chercheur-Boursier award from the Fonds de la Recherche du Québec en Santé (FRQS). G.E. holds a Canada Research Chair in Vesicular Trafficking and Cell Signaling. C.L., K.B.E.K., and C.Z. held Ph.D. training awards from the FRQS. K.B.E.K. also held a Ph.D. fellowship from the Fondation Desjardins and a Ph.D. fellowship from the Fondation du Grand Défi Pierre Lavoie. J.A.G. held postdoctoral fellowships from the CIHR and FRQS.

## Figure Legends

### **Figure 1: A proteomic strategy to characterize the 14-3-3 phosphorylation-dependent interactome**

(A) Scheme depicting the subtractive fractionation strategy used to enrich phosphorylation-dependent 14-3-3 binding proteins. (B) Following the protocol shown in (A), eluates were resolved by SDS-PAGE and gels were stained with Coomassie blue or subjected to immunoblotting using the 14-3-3-binding motif antibody (RXXpS/TXP). (C) Venn comparison of proteomic identifications between fly (black numbers) and mammalian datasets (white numbers). (D) Gene Ontology (GO) term enrichment of orthologous 14-3-3 interactors. (E)

Partial list of known (green arrow) and unknown conserved 14-3-3 client proteins identified in this study. A red arrow indicates Rip11 and orthologues.

### **Figure 2: Class I FIPs are conserved 14-3-3 binding proteins**

(A) Number of unique peptides and sequence coverage for class I and class II FIPs in the proteomic analysis of 14-3-3 interactors. (B) Lysates from HEK293 cells expressing GFP-tagged forms of mammalian class I and class II FIPs were incubated with GST::14-3-3 $\epsilon$ . After GST pull-down, 14-3-3 binding was analyzed by immunoblotting. (C) Lysates from HEK293 cells expressing GFP::FIP5 were incubated with GST::14-3-3 $\epsilon$  and GST::14-3-3 $\epsilon$ K19E. Binding to both forms of 14-3-3 was analyzed by immunoblotting. Expression of FIP5 was assessed by immunoblotting of total cell lysate, whereas the amount of GST::14-3-3 was evaluated by Coomassie staining of SDS-PAGE. (D) Lysates from S2 cells expressing GFP::Rip11 were incubated with GST::14-3-3 $\epsilon$  and GST::14-3-3 $\epsilon$ K49E and binding was analyzed as in (C). (E) Myc::FIP5 was immunoprecipitated from lysates of transfected HEK293 cells treated or not by  $\lambda$ -phosphatase ( $\lambda$ PPase). Direct 14-3-3 binding was analyzed by far-western blotting with purified GST::14-3-3 $\epsilon$ . (F) GFP::Rip11 was immunoprecipitated from lysates of transfected S2 cells treated or not by  $\lambda$ -phosphatase ( $\lambda$ PPase). Direct 14-3-3 $\epsilon$  binding was analyzed as in (E). (G) Myc::FIP5 was immunoprecipitated from lysates of HEK293 cells transfected with the indicated constructs. 14-3-3 binding was analyzed by immunoblotting. (H) Lysates from HEK293 cells expressing GFP::FIP5 were incubated with increasing concentrations of the R18 peptide and FIP5 binding to 14-3-3 $\epsilon$  was analyzed as in (B). (I) Lysates from S2 cells expressing GFP::Rip11 were incubated with increasing concentrations of the R18 peptide and Rip11 binding to 14-3-3 $\epsilon$  was analyzed as in (B).

### **Figure 3: 14-3-3 binds to T391 and S405 in the RBD of Rip11**

(A) Schematic diagram of the different GFP-tagged deletion and constructs of Rip11 that were generated for this study. Predicted 14-3-3 binding site (in red) were determined by using the prediction software 14-3-3-Pred (32). The conserved Y380 residue involved in Rab11 binding is shown in blue. (B) Lysates from S2 cells expressing the indicated GFP-tagged Rip11 constructs were incubated with GST::14-3-3 $\epsilon$  and pull-down assays were performed and analyzed as in Figure 2B. (C) Lysates from S2 cells expressing the indicated GFP-tagged Rip11 constructs were

incubated with GST::14-3-3 $\epsilon$  and pull-down assay were performed and analyzed as in (B). (D) Myc::14-3-3 $\epsilon$  was immunoprecipitated from lysates of S2 cells expressing the indicated GFP::Rip11 constructs and myc::14-3-3 $\epsilon$ . Binding of the Rip11 variants was analyzed by immunoblotting. (E) Pull-down assays from lysates of S2 cells expressing the indicated GFP-tagged Rip11 constructs and GST::Rab11CA were analyzed by immunoblotting.

**Figure 4: T391 and S405 are required for Rip11 distribution at the cleavage furrow**

(A) Representative images of endogenous Rip11 (green) at different stages of the cell cycle. Immunofluorescence of  $\alpha$ -Tubulin (red) and staining for nucleus (DAPI, blue) were performed to identify the cell cycle stage. Grayscale images of the green channel are shown. White arrowheads point to Rip11 vesicles on the microtubule network, whereas yellow arrowheads point to vesicles close to the plasma membrane. Scale bars are 8 $\mu$ m. (B) Representative examples of dividing S2 cells expressing mCherry::Rab11 (red) and GFP::Tubulin (separated greyscale images, lower panels) at the indicated cell cycle stage. Rip11 (green) is detected by immunofluorescence. High magnifications of areas close to the plasma membrane or to the central spindle are shown with grayscale images of the red and green channels. A dashed line delineates the cell perimeter. Scale bars are 8 $\mu$ m. (C) Selected frames of dividing S2 cells expressing  $\alpha$ -Tubulin::mCherry together with either GFP::Rip11WT (upper panel) or GFP::Rip11TS/AA (lower panel). Grayscale images of the green channel are shown. Scale bars are 8 $\mu$ m. (D-D') Enrichment of GFP::Rip11 at the cleavage furrow was calculated by dividing the background corrected mean fluorescence intensity measured inside boundaries of 1 $\mu$ m from the plane of the cleavage furrow  $F(\text{ROI})_{\text{out}}$ , over the background corrected mean fluorescence intensity measured in the whole dividing cell  $F(\text{cell})_{\text{out}}$ . 20 to 21 cells from 3 independent experiments were quantified for each condition (mean $\pm$ SEM).

**Figure 5: Rip11 is required for late cytokinesis in S2 cells**

(A) S2 cells were treated with the indicated dsRNA and multi-nucleation was quantified. A minimum of 600 cells per condition were scored from 3 independent experiments (mean $\pm$ SD). Rip11 CDS dsRNA stands for a dsRNA targeting the coding sequence and while the Rip11 5'UTR dsRNA targets the 5' untranslated region of Rip11. (B) Representative examples of control or Rip11-depleted S2 cells labelled with both F-actin (red) and DAPI (blue). Scale bars are 8  $\mu$ m. (C) The efficiency of the dsRNA targeting the 5'UTR of Rip11 was assessed by

immunoblotting of lysates from S2 cells treated as indicated. (D) Selected frames of representative dividing control or Rip11-depleted S2 cells expressing mCherry::Anillin (red) and Sqh::GFP (green). Yellow arrowhead indicates the formation of the midbody. Scale bars are 8  $\mu\text{m}$ .

### **Figure 6. Rip11 binding to 14-3-3 is required for completion of cytokinesis**

(A) Control S2 cells (-) or cells stably expressing the indicated GFP-tagged Rip11 constructs were treated with dsRNA against Rip11 and multi-nucleation was quantified. A minimum of 500 cells per condition were scored from 2 or 3 independent experiments (mean $\pm$ SD). (B) Representative images of late anaphase S2 cells depleted of endogenous Rip11 and expressing the indicated GFP-tagged Rip11 constructs, labelled with  $\alpha$ -Tubulin (red) and DAPI (blue). Scale bars are 10  $\mu\text{m}$ . (C) Myc::14-3-3 $\epsilon$  was immunoprecipitated from lysates of S2 cells expressing the indicated GFP-tagged Rip11 constructs and myc::14-3-3 $\epsilon$ . Binding of the Rip11 variants was analyzed as in Figure 3D. (D) GST pull-down assays were performed from lysates of S2 cells expressing the indicated GFP-tagged Rip11 and GST::Rab11CA and were analyzed as in Figure 3E.

### **Figure 7. Localization of Rip11 mutants during cytokinesis in rescue experiments.**

Representative images show S2 cells depleted of endogenous Rip11 and expressing the indicated GFP-tagged Rip11 constructs (green) at the indicated stages of mitosis. Cells were labeled with  $\alpha$ -tubulin (red) and DAPI (blue). Bars = 10  $\mu\text{m}$ .

### **References**

1. **Zhao J, Meyerkord CL, Du Y, Khuri FR, Fu H.** 2011. 14-3-3 proteins as potential therapeutic targets. *Semin Cell Dev Biol* **22**:705-712.
2. **Wang W, Shakes DC.** 1996. Molecular evolution of the 14-3-3 protein family. *J Mol Evol* **43**:384-398.
3. **Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H, Liddington R.** 1995. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* **376**:191-194.
4. **Gardino AK, Yaffe MB.** 2011. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol* **22**:688-695.

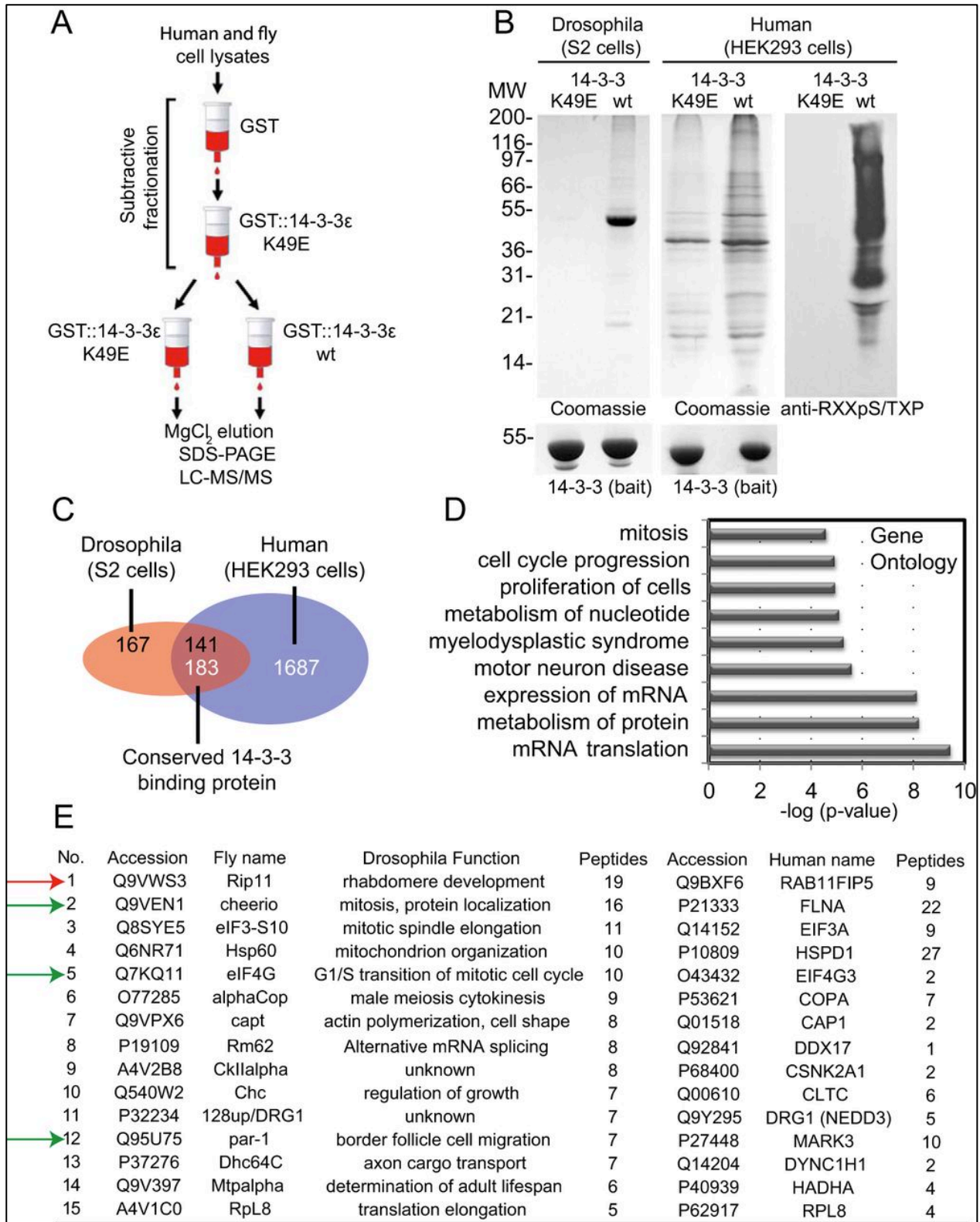
5. **Obsil T, Obsilova V.** 2011. Structural basis of 14-3-3 protein functions. *Semin Cell Dev Biol* **22**:663-672.
6. **Obsilova V, Kopecka M, Kosek D, Kacirova M, Kylarova S, Rezabkova L, Obsil T.** 2014. Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation. *Physiol Res* **63 Suppl 1**:S155-164.
7. **Reinhardt HC, Yaffe MB.** 2013. Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**:563-580.
8. **Zerial M, McBride H.** 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature reviews Molecular cell biology* **2**:107-117.
9. **Welz T, Wellbourne-Wood J, Kerkhoff E.** 2014. Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends Cell Biol* **24**:407-415.
10. **Horgan CP, McCaffrey MW.** 2009. The dynamic Rab11-FIPs. *Biochem Soc Trans* **37**:1032-1036.
11. **Lapierre LA, Avant KM, Caldwell CM, Oztan A, Apodaca G, Knowles BC, Roland JT, Ducharme NA, Goldenring JR.** 2012. Phosphorylation of Rab11-FIP2 regulates polarity in MDCK cells. *Molecular biology of the cell* **23**:2302-2318.
12. **Ducharme NA, Hales CM, Lapierre LA, Ham AJ, Oztan A, Apodaca G, Goldenring JR.** 2006. MARK2/EMK1/Par-1 $\alpha$  phosphorylation of Rab11-family interacting protein 2 is necessary for the timely establishment of polarity in Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular biology of the cell* **17**:3625-3637.
13. **Su T, Bryant DM, Luton F, Verges M, Ulrich SM, Hansen KC, Datta A, Eastburn DJ, Burlingame AL, Shokat KM, Mostov KE.** 2010. A kinase cascade leading to Rab11-FIP5 controls transcytosis of the polymeric immunoglobulin receptor. *Nat Cell Biol* **12**:1143-1153.
14. **Li D, Mangan A, Cicchini L, Margolis B, Prekeris R.** 2014. FIP5 phosphorylation during mitosis regulates apical trafficking and lumenogenesis. *EMBO reports* **15**:428-437.
15. **Li BX, Satoh AK, Ready DF.** 2007. Myosin V, Rab11, and dRip11 direct apical secretion and cellular morphogenesis in developing *Drosophila* photoreceptors. *J Cell Biol* **177**:659-669.
16. **Shaye DD, Casanova J, Llimargas M.** 2008. Modulation of intracellular trafficking regulates cell intercalation in the *Drosophila* trachea. *Nature cell biology* **10**:964-970.

17. **Schiel JA, Childs C, Prekeris R.** 2013. Endocytic transport and cytokinesis: from regulation of the cytoskeleton to midbody inheritance. *Trends Cell Biol* **23**:319-327.
18. **Wilson GM, Fielding AB, Simon GC, Yu X, Andrews PD, Hames RS, Frey AM, Peden AA, Gould GW, Prekeris R.** 2005. The FIP3-Rab11 protein complex regulates recycling endosome targeting to the cleavage furrow during late cytokinesis. *Molecular biology of the cell* **16**:849-860.
19. **Cao J, Albertson R, Riggs B, Field CM, Sullivan W.** 2008. Nuf, a Rab11 effector, maintains cytokinetic furrow integrity by promoting local actin polymerization. *J Cell Biol* **182**:301-313.
20. **Riggs B, Rothwell W, Mische S, Hickson GR, Matheson J, Hays TS, Gould GW, Sullivan W.** 2003. Actin cytoskeleton remodeling during early *Drosophila* furrow formation requires recycling endosomal components Nuclear-fallout and Rab11. *J Cell Biol* **163**:143-154.
21. **Mierzwa B, Gerlich DW.** 2014. Cytokinetic abscission: molecular mechanisms and temporal control. *Dev Cell* **31**:525-538.
22. **D'Avino PP, Giansanti MG, Petronczki M.** 2015. Cytokinesis in Animal Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**.
23. **Green RA, Paluch E, Oegema K.** 2012. Cytokinesis in animal cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**:29-58.
24. **Wilker EW, van Vugt MA, Artim SA, Huang PH, Petersen CP, Reinhardt HC, Feng Y, Sharp PA, Sonenberg N, White FM, Yaffe MB.** 2007. 14-3-3sigma controls mitotic translation to facilitate cytokinesis. *Nature* **446**:329-332.
25. **Douglas ME, Davies T, Joseph N, Mishima M.** 2010. Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis. *Curr Biol* **20**:927-933.
26. **Yuce O, Piekny A, Glotzer M.** 2005. An ECT2-centralspindlin complex regulates the localization and function of RhoA. *J Cell Biol* **170**:571-582.
27. **Zhao WM, Fang G.** 2005. MgcRacGAP controls the assembly of the contractile ring and the initiation of cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:13158-13163.
28. **Mishima M, Kaitna S, Glotzer M.** 2002. Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Dev Cell* **2**:41-54.

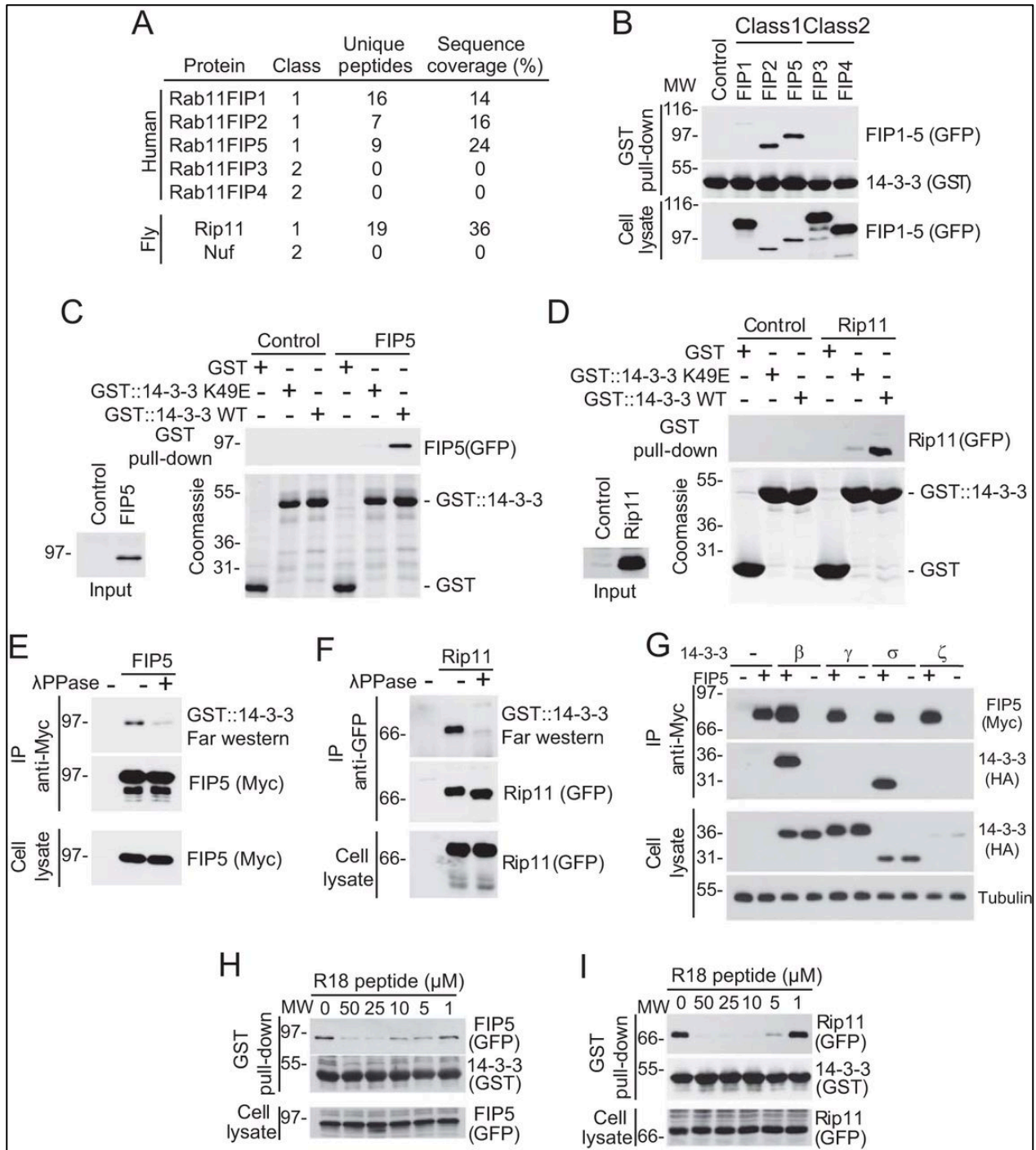


29. **Zhang L, Wang H, Liu D, Liddington R, Fu H.** 1997. Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3zeta through a common site involving lysine 49. *J Biol Chem* **272**:13717-13724.
30. **Wang B, Yang H, Liu YC, Jelinek T, Zhang L, Ruoslahti E, Fu H.** 1999. Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry* **38**:12499-12504.
31. **Petosa C, Masters SC, Bankston LA, Pohl J, Wang B, Fu H, Liddington RC.** 1998. 14-3-3zeta binds a phosphorylated Raf peptide and an unphosphorylated peptide via its conserved amphipathic groove. *J Biol Chem* **273**:16305-16310.
32. **Madeira F, Tinti M, Murugesan G, Berrett E, Stafford M, Toth R, Cole C, MacKintosh C, Barton GJ.** 2015. 14-3-3-Pred: improved methods to predict 14-3-3-binding phosphopeptides. *Bioinformatics* **31**:2276-2283.
33. **Laflamme C, Assaker G, Ramel D, Dorn JF, She D, Maddox PS, Emery G.** 2012. Evi5 promotes collective cell migration through its Rab-GAP activity. *J Cell Biol* **198**:57-67.
34. **Jagoe WN, Lindsay AJ, Read RJ, McCoy AJ, McCaffrey MW, Khan AR.** 2006. Crystal structure of rab11 in complex with rab11 family interacting protein 2. *Structure* **14**:1273-1283.
35. **Shiba T, Koga H, Shin HW, Kawasaki M, Kato R, Nakayama K, Wakatsuki S.** 2006. Structural basis for Rab11-dependent membrane recruitment of a family of Rab11-interacting protein 3 (FIP3)/Arfophilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15416-15421.
36. **Kechad A, Jananji S, Ruella Y, Hickson GR.** 2012. Anillin acts as a bifunctional linker coordinating midbody ring biogenesis during cytokinesis. *Curr Biol* **22**:197-203.
37. **Kelly EE, Horgan CP, Adams C, Patzer TM, Ni Shuilleabhain DM, Norman JC, McCaffrey MW.** 2010. Class I Rab11-family interacting proteins are binding targets for the Rab14 GTPase. *Biol Cell* **102**:51-62.
38. **Kouranti I, Sachse M, Arouche N, Goud B, Echard A.** 2006. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis. *Curr Biol* **16**:1719-1725.
39. **Dambournet D, Machicoane M, Chesneau L, Sachse M, Rocancourt M, El Marjou A, Formstecher E, Salomon R, Goud B, Echard A.** 2011. Rab35 GTPase and OCRL phosphatase remodel lipids and F-actin for successful cytokinesis. *Nat Cell Biol* **13**:981-988.

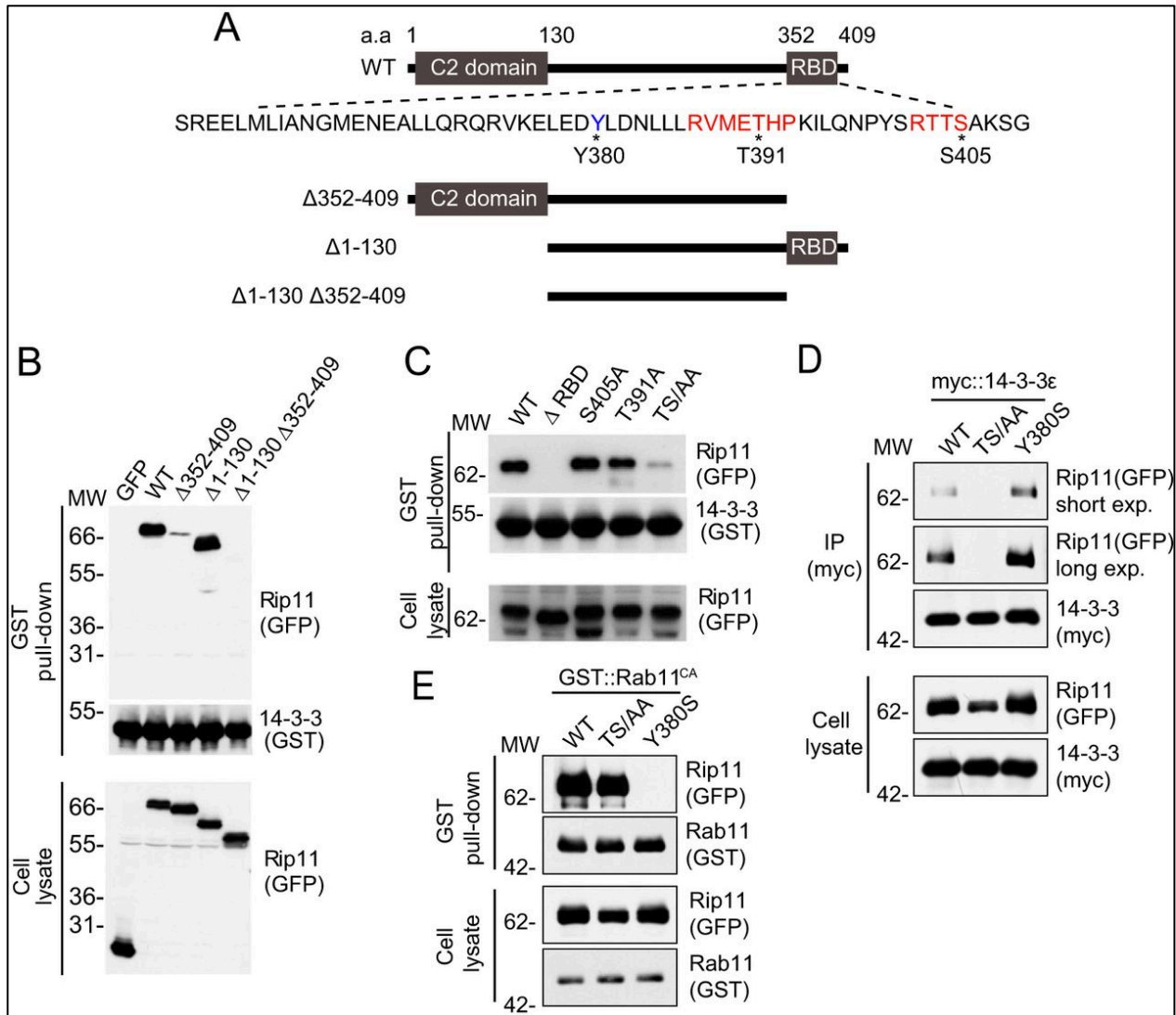
40. **Joseph N, Hutterer A, Poser I, Mishima M.** 2012. ARF6 GTPase protects the post-mitotic midbody from 14-3-3-mediated disintegration. *EMBO J* **31**:2604-2614.
41. **Schonteich E, Wilson GM, Burden J, Hopkins CR, Anderson K, Goldenring JR, Prekeris R.** 2008. The Rip11/Rab11-FIP5 and kinesin II complex regulates endocytic protein recycling. *Journal of cell science* **121**:3824-3833.
42. **Hales CM, Vaerman JP, Goldenring JR.** 2002. Rab11 family interacting protein 2 associates with Myosin Vb and regulates plasma membrane recycling. *The Journal of biological chemistry* **277**:50415-50421.
43. **Li D, Kuehn EW, Prekeris R.** 2014. Kinesin-2 mediates apical endosome transport during epithelial lumen formation. *Cellular logistics* **4**:e28928.
44. **Brownlow N, Pike T, Crossland V, Claus J, Parker P.** 2014. Regulation of the cytokinesis cleavage furrow by PKCepsilon. *Biochem Soc Trans* **42**:1534-1537.
45. **El Amine N, Kechad A, Jananji S, Hickson GR.** 2013. Opposing actions of septins and Sticky on Anillin promote the transition from contractile to midbody ring. *J Cell Biol* **203**:487-504.
46. **Ben El Kadhi K, Roubinet C, Solinet S, Emery G, Carreno S.** 2011. The inositol 5-phosphatase dOCRL controls PI(4,5)P2 homeostasis and is necessary for cytokinesis. *Curr Biol* **21**:1074-1079.
47. **Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J.** 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13489-13494.
48. **Laflamme C, Emery G.** 2015. In Vitro and In Vivo Characterization of the Rab11-GAP Activity of Drosophila Evi5. *Methods Mol Biol* **1298**:187-194.
49. **Ballif BA, Cao Z, Schwartz D, Carraway KL, 3rd, Gygi SP.** 2006. Identification of 14-3-3epsilon substrates from embryonic murine brain. *J Proteome Res* **5**:2372-2379.



**Figure 1: A proteomic strategy to characterize the 14-3-3 phosphorylation-dependent interactome.**



**Figure 2: Class I FIPs are conserved 14-3-3 binding proteins.**



**Figure 3: 14-3-3 binds to T391 and S405 in the RBD of Rip11.**

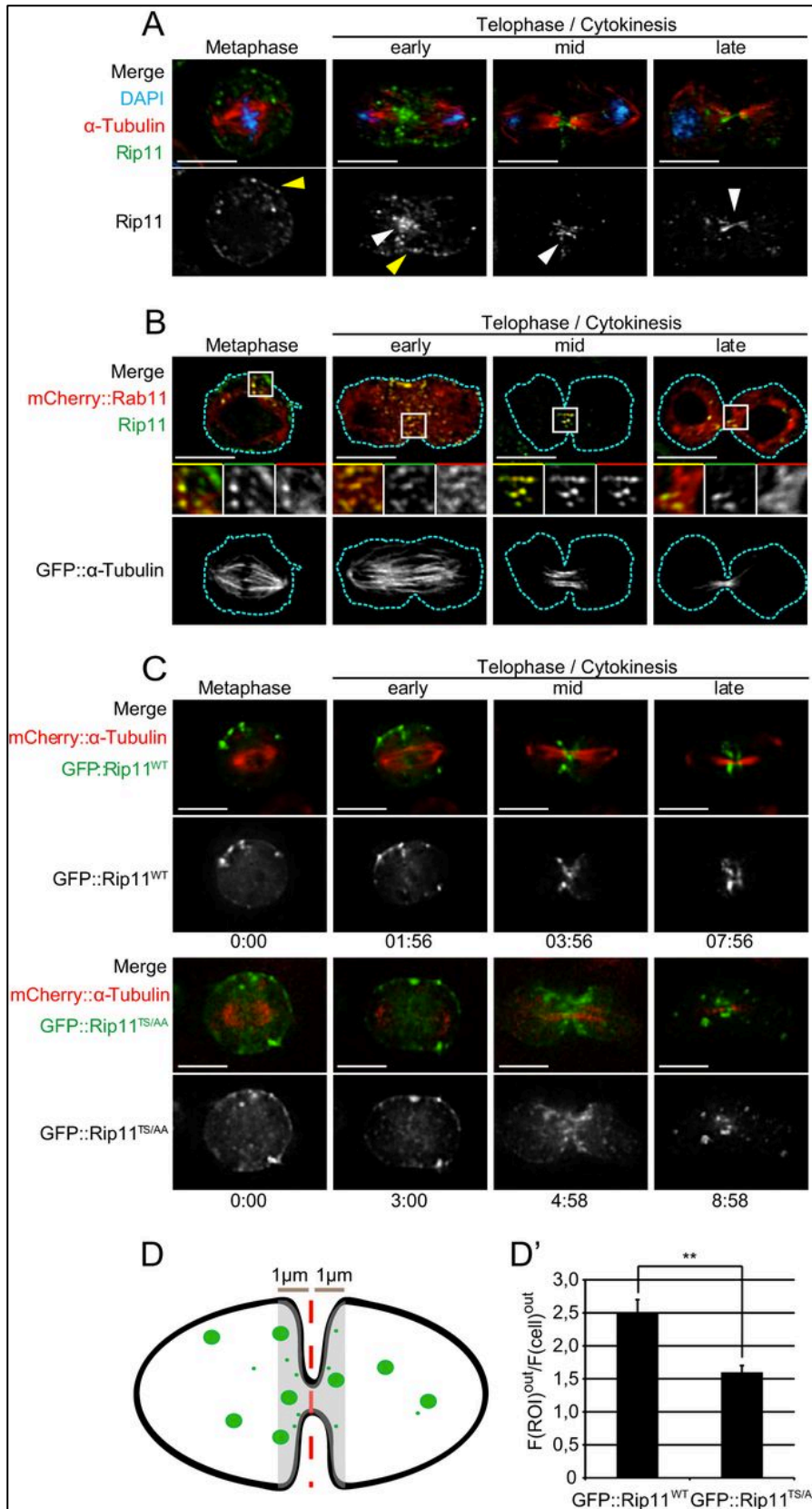
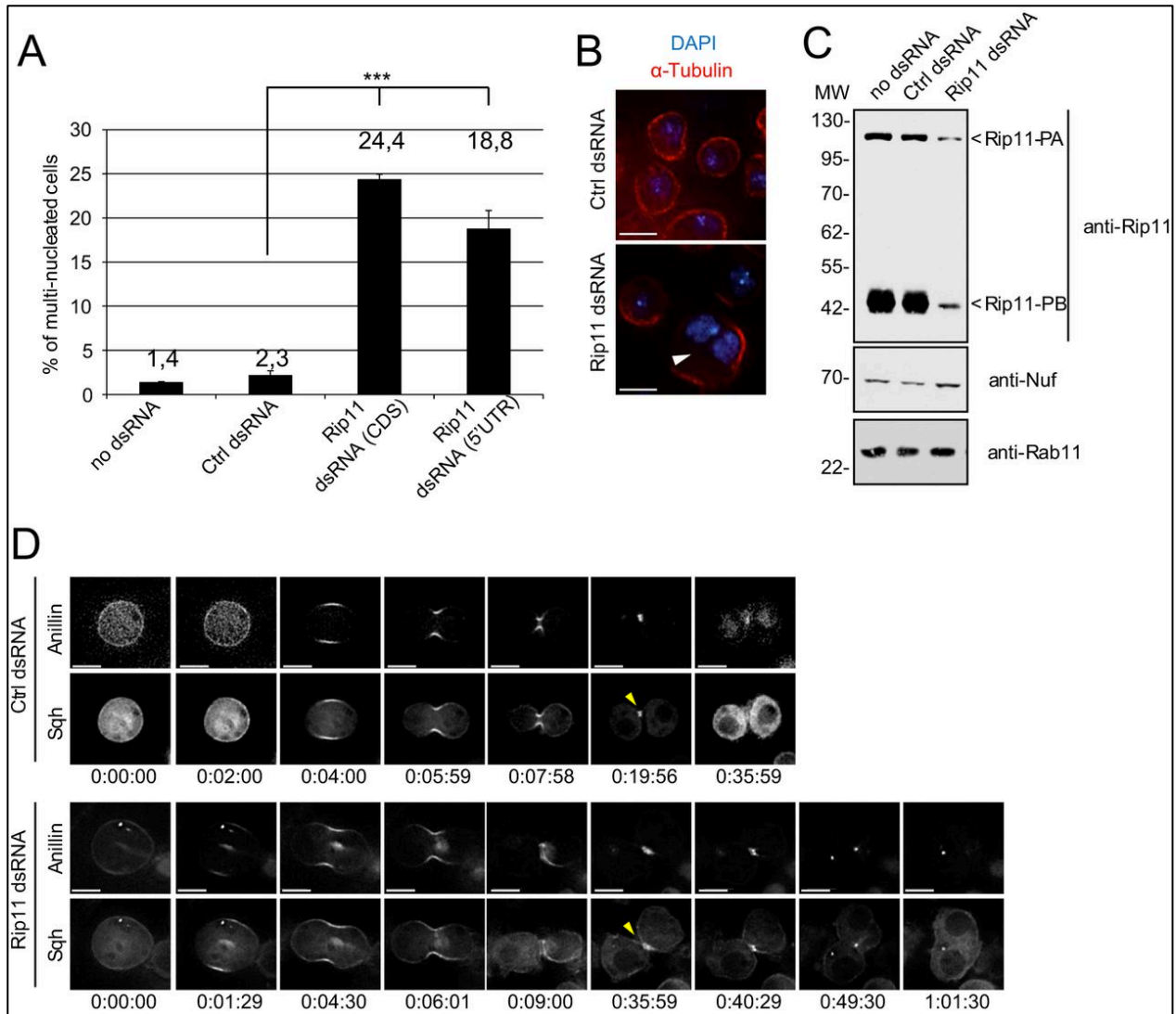
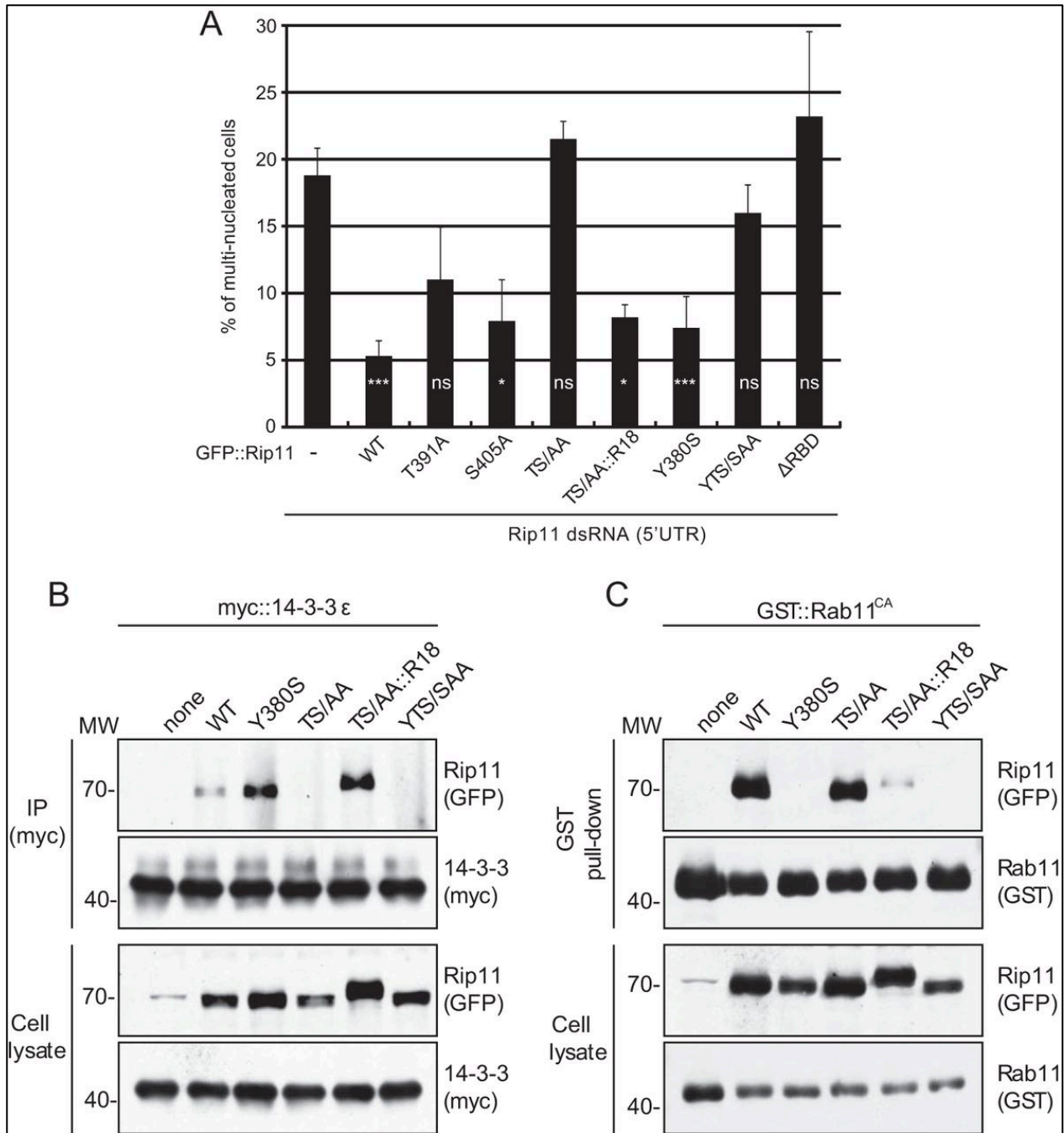


Figure 4: T391 and S405 are required for Rip11 distribution at the cleavage furrow.

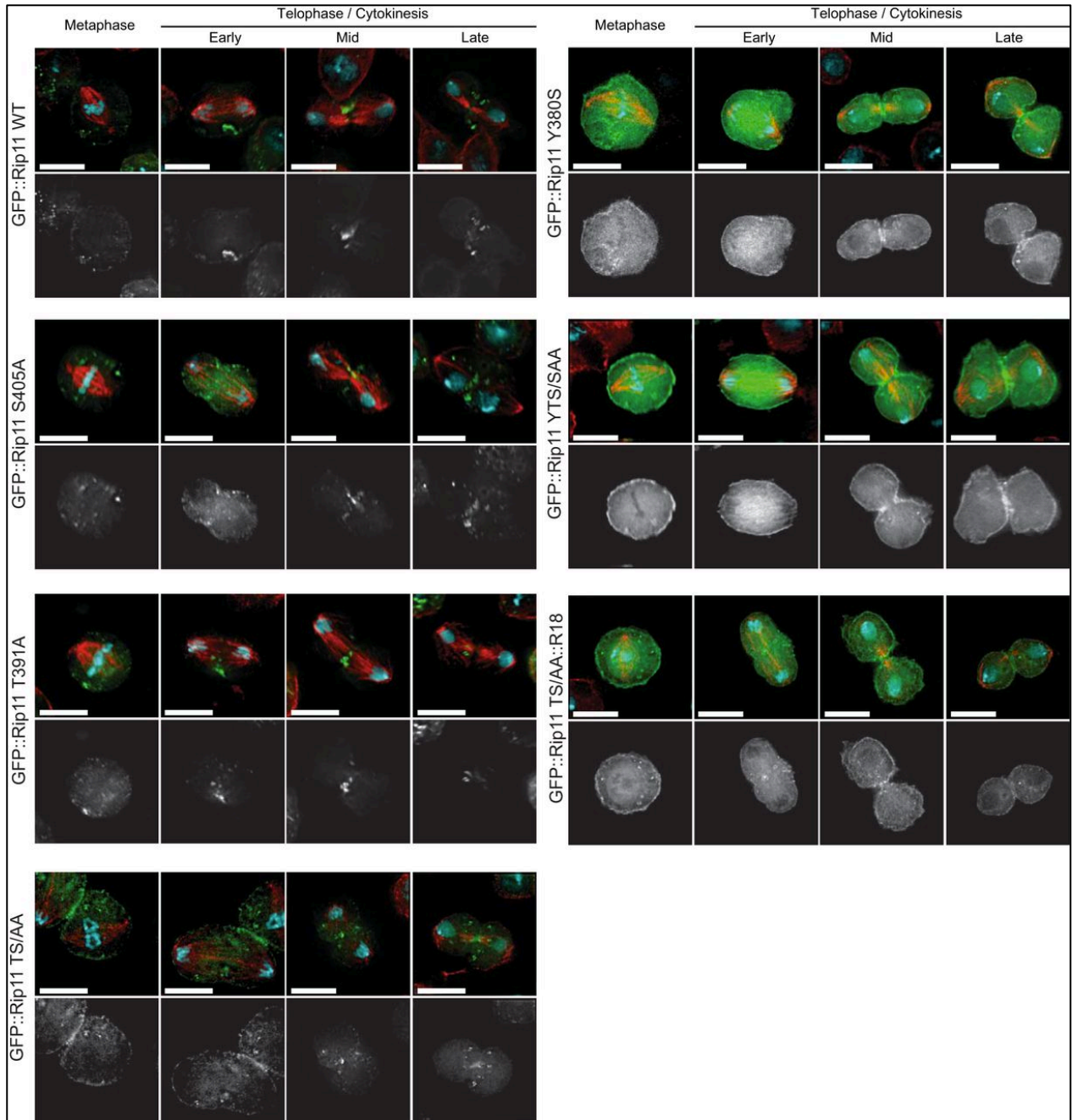






**Figure 6. Rip11 binding to 14-3-3 is required for completion of cytokinesis.**





**Figure 7. Localization of Rip11 mutants during cytokinesis in rescue experiments.**

